

Veterinär-Anatomisches Institut  
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich  
Direktor: Prof. Dr. Alois Boos

---

**Immunhistochemischer Nachweis von  
Calbindin D9k  
in den verschiedenen Darmabschnitten des Kaninchens**

INAUGURAL- DISSERTATION  
zur Erlangung der Doktorwürde  
an der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von  
**Corinne Schroeter-Vogt**  
Tierärztin aus Zürich (ZH)

genehmigt auf Antrag von  
Prof. Dr. Alois Boos, Referent  
PD Dr. Annette Liesegang, Korreferentin

Zürich 2011

**Für meine kleine Familie**

## Inhaltsverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Summary</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>Grundlagen</b>	<b>5</b>
4.1	Topographie und Morphologie des Magen-Darm-Traktes beim Kaninchen	5
4.1.1	Anatomie des Magen-Darm-Traktes	5
4.1.2	Histomorphologische Beschreibung des Magen-Darm-Traktes	8
4.1.2.1	Tunica mucosa	9
4.1.2.2	Tela submucosa	10
4.1.2.3	Tunica muscularis	11
4.1.2.4	Tunica serosa	11
4.1.3	Physiologie des Magen-Darm-Traktes des Kaninchens	11
4.1.4	Caecotrophie	14
<b>4.2</b>	<b>Bedeutung und Regulation der Calcium-Homöostase</b>	<b>17</b>
4.2.1	Besonderheiten des Calciumstoffwechsels beim Kaninchen	19
<b>4.3</b>	<b>Mechanismen der gastrointestinalen Calciumabsorption</b>	<b>21</b>
4.3.1	Passiver parazellulärer Calciumtransport	21
4.3.2	Aktiver transzellulärer Calciumtransport	21
<b>4.4</b>	<b>Regulation des epithelialen Ca-Transports</b>	<b>24</b>
4.4.1	Vitamin D	24
4.4.2	Vitamin D-Rezeptor	26
<b>4.5</b>	<b>Calbindin</b>	<b>27</b>
4.5.1	Lokalisation, Molekulargewicht und Vorkommen	27
4.5.2	Struktur und Funktion von Calbindin D9k	27

<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>30</b>
5.1	Versuchstiere	30
5.2	Aufarbeitung des Probenmaterials	33
5.3	Histologie	35
5.4	Immunhistochemische Methode für Calbindin D9k	35
5.5	Auswertung	38
5.6	Statistik	39
<b>6</b>	<b>Resultate</b>	<b>40</b>
6.1	Immunhistochemischer Nachweis von Calbindin D9k	41
6.1.1	Darmabschnitte	41
6.1.2	Epithellokalisationen	46
6.1.2.1	Duodenum	46
6.1.2.2	Caecum	49
6.1.2.3	Gegenüberstellung der Immunoreaktivität von Duodenum und Caecum	51
<b>7</b>	<b>Diskussion</b>	<b>53</b>
7.1	Diskussion der Resultate	53
7.1.1	Nachweis von Calbindin D9k	53
7.2.2	Einfluss der Rationsgestaltung	56
7.2	Schlussfolgerungen	58
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>60</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>66</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	<b>69</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf</b>	

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
Ca	Calcium
Ca <sup>2+</sup>	ionisiertes Calcium
CaBP	Calcium bindende Proteine
Cae-KrM	Caecum Kryptenmündung
Cae-ObEp	Caecum Oberflächenepithel
Cb-D9k	Calbindin D9k
Cb-D28k	Calbindin D28k
CSM	Colonic separation mechanism
CT	Calcitonin
DAB	Diaminobenzidin
DD-ZB	Duodenum Zottenbasis
DD-ZM	Duodenum Zottenmitte
DD-ZS	Duodenum Zottenspitze
FI	Farbintensität
G	Grasmehl
GALT	gut associated lymphoid tissue
GG	Gras- und Getreidemehl
kDA	Kilodalton
L	Luzernemehl
LG	Luzerne- und Getreidemehl
MW	Mittelwert
NCX1	Natrium/Calcium-Austauscher
p	Wahrscheinlichkeit (probability)
P	Phosphor
PMCA	plasma membrane calcium ATPase
PTH	Parathormon
Rfe	Rohfett
STD	Standardabweichung
spp.	species pluralis
TBS	Tris-buffered saline

TS	Trockensubstanz
TRPV	transient receptor potential vanilloid channel
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VDRmem	membranständiger VDR
VDRnuc	nukleärer VDR
1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1,25 Dihydroxicholecalciferol oder Calcitriol



## 1 Zusammenfassung

Im Darm reguliert die biologisch aktive Form des Vitamin D<sub>3</sub> (Calcitriol) die drei Teilschritte der aktiven, transzellulären Ca-Resorption mittels der Expression epithelialer Ca-Kanäle, des cytosolischen Transportproteins Calbindin-D9k (Cb-D9k) sowie der membranständigen Ca-ATPase. Beim Kaninchen (Vertreter der Caecotrophen) ist bezüglich des aktiven, Vitamin-D-stimulierbaren Ca-Transports wenig bekannt.

Um den Einfluss unterschiedlicher Calcium- und Phosphorgehalte in der Ration auf die Ca-Absorption im Kaninchendarm zu überprüfen, wurden vier Fütterungsgruppen gebildet. Als Parameter wurden erstmals das Vorkommen sowie die Verteilung des calciumbindenden Proteins Cb-D9k herangezogen, immunhistochemisch nachgewiesen und mittels Mikrodensitometrie quantifiziert.

Calbindin-D9k konnte in den Enterozyten des Oberflächenepithels von Duodenum und Caecum aller vier Fütterungsgruppen nachgewiesen werden. In den mit Luzernemehl zugefütterten Gruppen war die Cb-D9k-Immunoreaktion besonders stark ausgeprägt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen die Hypothese, dass beim Kaninchen die aktive, transzelluläre Ca-Absorption vorwiegend im Duodenum und im Caecum stattfindet und bei steigendem Ca-Gehalt in der Ration hochreguliert wird.

## 2 Summary

The active form of the vitamin D<sub>3</sub>-hormone (calcitriol) regulates the three characteristic steps of transcellular intestinal Ca-absorption by inducing gene transcription of the following proteins: the luminal Ca-channels TRPV5/6, the cytosolic Ca-binding protein Calbindin D9k (Cb-D9k) and the basolateral plasma membrane Ca-ATPase. So far only a few studies about the active intestinale Ca-absorption exist for the hindgut fermenters such as the rabbit.

To investigate the influence of a different Ca and P content in the ration of rabbits on the Ca absorption in the intestine, four different feeding groups were formed. For the first time, the presence and localisation of the Ca-binding protein Cb-D9k in the different parts of the intestine of the rabbit was measured and quantified for the first time by a immunohistochemical method.

Cb-D9k immunoreactions were observed in the enterocytes of the surface epithelium in duodenum and caecum of all four feeding groups. The two groups fed by alfalfa-flour showed the highest Cb-D9k concentration.

The results of this study demonstrate, that beside the duodenum, the caecum is the main site in active intestinal Ca-absorption of the rabbit. Furthermore it can be concluded that a different Ca and P concentration in diets has a remarkable influence on active intestinal Ca-absorption in this species.

### 3 Einleitung

Mechanismen der gastrointestinalen Absorption von Calcium (Ca) stehen seit Jahren im Zentrum verschiedenster Forschungsarbeiten. Das mit dem Futter aufgenommene Ca wird von den meisten Säugetieren über zwei Wege absorbiert. Bei einer ausreichenden Ca-Zufuhr gelangt Ca mittels passiver Diffusion entlang eines chemischen Gradienten in die Blutbahn. Diese parazelluläre Ca-Absorption stellt einen nicht sättigbaren Transportmechanismus dar und unterliegt keiner direkten Regulation. Der aktive Transportmechanismus hingegen, welcher vorwiegend bei moderaten Ca-Gehalten im Futter stattfindet, ist Vitamin D-abhängig und gliedert sich in folgende drei Teilschritte: Erstens findet an der apikalen Bürstensaummembran der Enterocyten über zwei spezifische epitheliale Ca-Kanäle (TRPV5 und TRPV6) ein passiver Ca-Einstrom in das Cytosol statt. Zweitens wird mittels reversibler Bindung an Calbindin D9k (Cb-D9k) das Ca durch das Cytosol transportiert. Drittens wird an der basolateralen Membran durch die Ca-ATPase (PMCA<sub>1b</sub>) und durch den Na/Ca-Austauscher (NCX1) Ca wieder ausgeschleust (Bronner, 2009). Die drei Phasen der aktiven, transzellulären Ca-Absorption werden durch den Vitamin D-Metaboliten 1,25(OH)<sub>2</sub>-D (Calcitriol) reguliert. Die Komplexbildung von Calcitriol mit dem nucleären Vitamin D-Rezeptor (VDR<sub>nuc</sub>) aktiviert in den Enterocyten die Genexpression des cytosolischen Transportproteins Cb-D9k, der Ca-Kanäle TRPV5 und 6, sowie der membranständigen Ca-ATPase PMCA (Norman, 2006). Während der aktive Transportmechanismus hauptsächlich bei einer ungenügenden Ca-Versorgung stattfindet und sich bei den meisten Tierarten vorwiegend auf die proximalen Dünndarmschnitte beschränkt, erfolgt der passive Transport über den gesamten Darmtrakt (Hoenderop et al. 2005; Eckermann-Ross, 2008). Eine Studie beschreibt, dass beim Kaninchen der passive Transport sehr effizient ist und überwiegt (Eckermann-Ross, 2008).

Das Kaninchen nimmt in Bezug auf den Ca-Metabolismus in vielerlei Hinsicht einen Sonderstatus ein. So liegt der Serum-Ca-Gehalt um 30-50% höher als bei den anderen Säugern und bewegt sich in weniger engen Bandbreiten (Eckermann-Ross, 2008). Die intestinale Ca-Absorption erfolgt nicht bedarfsorientiert, sondern ist abhängig vom Ca-Gehalt in der Nahrung. Überschüssiges Ca wird beim Kaninchen mit dem Harn ausgeschieden (Schlölaut, 2003). Bei den meisten anderen Säugetieren ist die Regulation der intestinalen Ca-Absorption dafür verantwortlich, dass nur das

vom Organismus benötigte Ca absorbiert und der Überschuss über den Darm eliminiert wird. Neben Spezies und Ca-Angebot in der Nahrung spielt auch der physiologische Zustand eines Tieres eine wichtige Rolle bei der intestinalen Ca-Absorption. Das Kaninchen wird aufgrund seiner Verdauungsphysiologie zu den Dickdarmverdauern gezählt. Da die mikrobielle Fermentation beim Kaninchen vorwiegend im Caecum stattfindet, spricht man von einem Caecumverdauer. Im Gegensatz dazu wird der Dickdarmverdauer Pferd zu den Colonverdauern gezählt. Untersuchungen haben gezeigt, dass beim Pferd die aktive Ca-Absorption hauptsächlich im vorderen Dünndarm und dort vor allem im Duodenum stattfindet (Stanik, 2006; Müller, 2010). Für das Kaninchen als Vertreter der caecotrophen Tierarten liegen bezüglich der aktiven, transzellulären Ca-Absorption im Darmtrakt bislang kaum Studien vor. In der Arbeit über die Verteilung von Vitamin D-Rezeptoren (VDR) im Kaninchendarm von de Vries de Heekelingen (2008) wurde die grösste Menge VDR im Caecum nachgewiesen. Im Dünndarm nahm ihre Menge von proximal nach distal ab.

Das Ziel dieser Studie war es, das Vorkommen und die Lokalisation des Calcium-bindenden Proteins Calbindin-D9k (Cb-D9k) in den verschiedenen Darmabschnitten des Kaninchens immunhistochemisch nachzuweisen und mittels Mikrodensitometrie zu quantifizieren. Zudem wurde durch die Bildung von vier Fütterungsgruppen (L, G, LG, GG) überprüft, inwiefern sich ein unterschiedlicher Calcium- und Phosphorgehalt der Ration auf die Ca-Absorption im Kaninchendarm mit Cb-D9k als Parameter auswirkt.

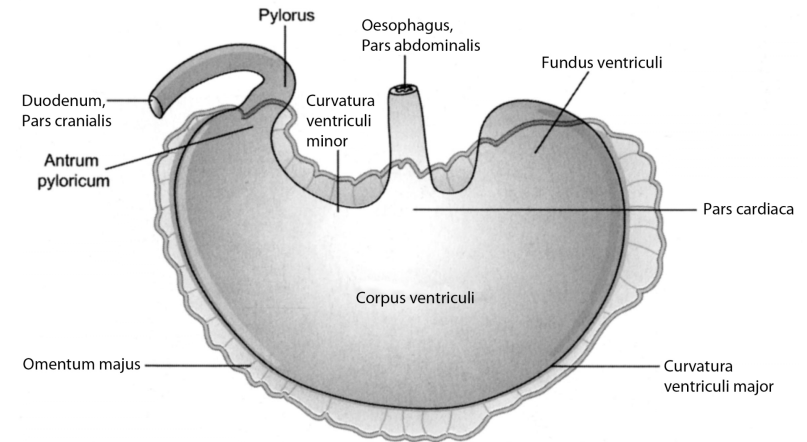
In der vorliegenden Studie wurden die Darmproben von 24 sieben Monate alten Kaninchen der Rasse New Zealand White Rabbit verwendet. Während der Versuchsperiode wurden die heranwachsenden Tiere über einen Zeitraum von 20 Wochen in vier Gruppen mit Pelletfutter gehalten, welches aus Luzernemehl (Gruppe L), Gras-mehl (Gruppe G) oder einer Mischung aus Gras- und Getreidemehl (Gruppe GG) bzw. Luzerne- und Getreidemehl (Gruppe LG) bestand. Für den immunhistochemischen Nachweis von Cb-D9k wurden einerseits die fünf Darmabschnitte (Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecum, Colon) eines Tieres miteinander verglichen und andererseits die Caeci und Duodeni der vier Fütterungsgruppen einander gegenübergestellt, um so den Einfluss der Fütterung zu veranschaulichen.

## 4 Grundlagen

### 4.1 Topographie und Morphologie des Magen-Darm-Traktes beim Kaninchen

#### 4.1.1 Anatomie des Magen-Darm-Traktes

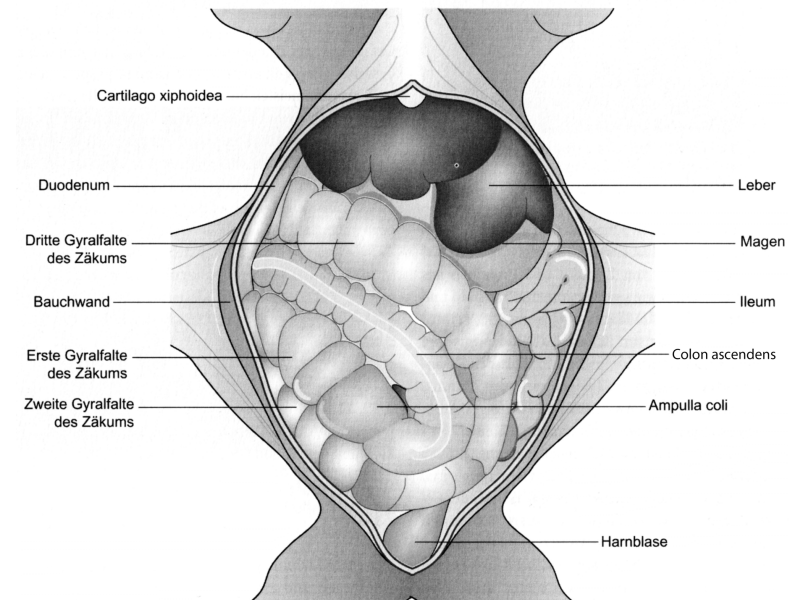
Kaninchen besitzen als Pflanzenfresser einen langen Verdauungskanal, da sie Dickdarmverdauung sind. Mit einer Gesamtlänge von 4 bis 6,5 m übertrifft er die Körperlänge beinahe um das 10fache (Schley, 1985). Nachdem die Nahrung die Mundhöhle und die Speiseröhre passiert hat, verweilt der Chymus vorerst im Magen. Das Kaninchen hat einen verhältnismässig grossen, einhöhligen und J-förmigen Magen. Die Kardia liegt im Zentrum der kleinen Kurvatur (s. Abb.1) und ist mit einem drüsenlosen, mehrschichtigen Plattenepithel ausgekleidet. Die Lage der Kardia, sowie ein stark muskulöser Kardia-Sphinkter haben zur Folge, dass Kaninchen nicht erbrechen können (O'Malley, 2008). Die Magenwand des Kaninchens ist dünn und schwach bemuskelt. Dadurch ist der Weitertransport des Chymus nur durch eine erneute Futteraufnahme möglich (Schulze, 2005). In der Regel nimmt das Kaninchen pro Tag 20-30 Mahlzeiten von je 6 Minuten Dauer zu sich (Schley, 1985). Bei zu langen Fütterungsabständen besteht die Gefahr, dass sich die Tiere durch zu grosse und auf einmal aufgenommene Futtermengen überfressen und dadurch Fehlgärungen begünstigt werden. Durch das Unvermögen zu Erbrechen kann so rasch ein lebensbedrohlicher Zustand entstehen.



**Abb. 1:** Äussere Ansicht des Kaninchenmagens mit der Lokalisation der Kardia im Zentrum der kleinen Kurvatur (O'Malley, 2008).

Der Dünndarm des Kaninchens ist verhältnismässig kurz und umfasst nur 12% des Volumens des gesamten Gastrointestinaltraktes (Donnelly, 1997). Der Dünndarm gliedert sich in Duodenum, Jejunum und Ileum. Sowohl das Duodenum als auch das Jejunum weisen ein kleines Lumen auf. Da das Duodenum in einem spitzen Winkel der Leber anliegt, ist es durch diese leicht komprimierbar (O'Malley, 2008). Das relativ lange Ileum mündet in das Caecum und ist an dieser Stelle zum so genannten *Sacculus rotundus* (oder *Ampulla ilei*) erweitert. Diese Erweiterung ist für das Kaninchen charakteristisch und bildet die Verbindungsstelle zwischen Ileum, Caecum und proximalem Colon. In der Lamina propria und der Submucosa des *Sacculus rotundus* befindet sich eine grosse Ansammlung an Lymphfollikeln (Schulze, 2005). Ähnlich zu den anderen Monogastriern sind beim Kaninchen die drei Dünndarmabschnitte hauptverantwortlich für die enzymatische Verdauung und Resorption von Spaltprodukten, sowie von Mineralstoffen und Vitaminen (Fekete und Wiesenmüller, 1993). Der grosse Dickdarm des Kaninchens besteht aus dem Blinddarm (Caecum), dem Grimmdarm (Colon) und dem Mastdarm (Rectum). Das Kaninchen besitzt einen auffallend grossen Blinddarm. Mit einem Anteil von 40% am gesamten Darmvolumen ist das Caecum des Kaninchens, im Verhältnis zur Körpergrösse, der grösste Blinddarm innerhalb des ganzen Tierreichs (O'Malley, 2008). Das Caecum verfügt über

das 8-12fache Fassungsvermögen des Magens und ist für den mikrobiellen Aufschluss der Rohfaser verantwortlich (Schulze, 2005). Das grosse Volumen scheint für gleichbleibende Bedingungen im Caecum mitverantwortlich zu sein. So kann sich eine Darmflora ausbilden, die gut an das vom Dünndarm kommende Substrat angepasst ist (Vernay, 1987). Die häufigsten Mikroorganismen im Caecum von Kaninchen sind *Bacteroides* spp., Ziliaten, Hefen und in geringeren Mengen *E.coli* und Clostridien. Bei den anderen Pflanzenfressern überwiegen die Lactobazillen (O'Malley, 2008). Der Blinddarm lässt sich in einen Kopf, *Basis caeci*, einen Körper, *Corpus caeci* und eine Spitze, *Apex caeci*, unterteilen. Der beim Kaninchen vorhandene Wurmfortsatz, *Appendix vermiformis*, ist mit zahlreichen Lymphfollikeln versehen, die etwa die Hälfte des darmassoziierten lymphatischen Gewebes ausmachen (GALT). Zudem werden im Wurmfortsatz Bikarbonat und Wasser sezerniert. Dadurch wird einerseits die Abpufferung der Säuren im Caecum und andererseits die Bildung einer halbflüssigen Caecal-Paste erreicht (O'Malley, 2008). Aus dem Caecumkopf geht das Colon ascendens hervor, dessen erweiterter Anfangsteil als *Ampulla coli* (s. Abb.2) bezeichnet wird (Schulze, 2005; O'Malley, 2008). Caecum und Ampulla coli bilden eine strukturelle und funktionelle Einheit, in welcher die Hauptfermentation stattfindet (Vernay, 1987). Auf das Colon ascendens folgt das kurze Colon transversum. Dieses mündet in das in zahlreiche Schleifen gelegte Colon descendens. Funktionell lässt sich das Colon in einen proximalen und einen etwas längeren distalen Abschnitt unterteilen. Dazwischen befindet sich der für die Kaninchen spezifische *Fusus coli* (Kolonspindel). Die Kolonspindel stellt einen 5-8 cm langen Abschnitt dar, welcher mit einer verdickten, zirkulären Muskulatur ausgestattet ist und eine verdickte Mukosa aufweist. Mit der Funktion als Schrittmacher kontrolliert der *Fusus coli* die Passage des Chymus zum distalen Grimmdarm (O'Malley, 2008). Als letzter Abschnitt des Dickdarms reiht sich das Rektum recht gerade und mittig innerhalb der Beckenhöhle an.



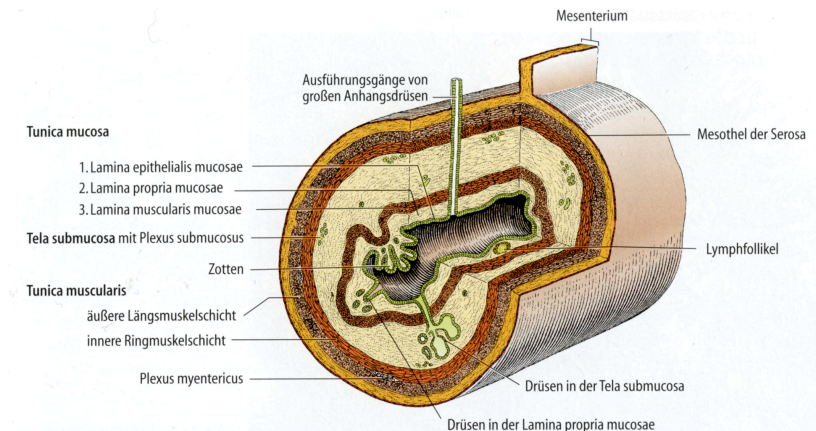
**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Ventralansicht der Baucheingeweide (O'Malley, 2008).

#### 4.1.2 Histomorphologie des Magen-Darm-Traktes

Die Wandstruktur des gesamten Verdauungskanal ist nahezu gleichartig organisiert. Von Darmabschnitt zu Darmabschnitt kann diese leichte Modifikationen aufweisen. Folgende Schichten und Unterschichten sind gemeinsam (s. Abb.3):

- Tunica mucosa (Schleimhaut)
  - Lamina epithelialis mucosae
  - Lamina propria mucosae
  - Lamina muscularis mucosae
- Tela submucosa (Unterschleimhaut)

- Tunica muscularis (Muskelhaut)
  - Stratum circulare
  - Stratum longitudinale
  
- Tunica serosa/adventitia (Serosaschicht)
  - Lamina propria serosae
  - Mesothelium



**Abb. 3:** Aufbau der Darmwand (Junqueira et al., 2002).

#### 4.1.2.1 Tunica mucosa

Die drei Schichten der Schleimhaut erfüllen hauptsächlich die Aufgabe einer Diffusionsbarriere und üben eine gewisse Funktion als Barriere gegenüber dem antigenbelasteten Darminhalt aus (Weyrauch et al., 1998).

Die Schleimhaut ist zwecks Oberflächenvergrößerung in Falten (Plicae circulares) und Zotten (Villi intestinales) angelegt und die Endothelzellen selbst besitzen einen Bürstensaum (Mikrovilli). Die Dünndarmoberfläche wird durch diese Strukturen um etwa das 200- bis 250fache vergrößert. Die Dichte und die Höhe der Falten sind im Duodenum am grössten und nehmen nach distal ab. Die Dickdarmmukosa ist durch das Fehlen von Zotten gekennzeichnet. Im gesamten Darmkanal kommen lange, dicht nebeneinander stehende, unverzweigte und gerade *Glandulae intestinales* (Krypten) vor (Junqueira et al., 2002).

Die der Resorption und Sekretion dienende Lamina epithelialis mucosae des Rumpfdarmes ist als einschichtiges, hochprismatisches Epithel ausgebildet. Eine Ausnahme stellt der Endabschnitt des Afters dar, dessen vorwiegende Schutzfunktion durch ein mehrschichtiges, unverhorntes Plattenepithel gewährleistet wird (Salomon, 2005). Das Epithel ist generell mit zwei Zelltypen ausgestattet. Einerseits den Enterozyten oder Saumzellen mit einer apikalen Bürstensaummembran aus Mikrovilli und andererseits den Becherzellen. Die Menge der Schleim produzierenden Becherzellen nimmt nach kaudal mit der fortschreitenden Eindickung des Darminhaltes stetig zu.

Die aus lockerem Bindegewebe bestehende Lamina propria mucosae enthält nebst Blut- und Lymphgefäßen zahlreiche Drüsen, glatte Muskulatur sowie lymphatische Zellen.

Als innerste Schicht der Tunica mucosa reiht sich die aus glatter Muskulatur bestehende Lamina muscularis mucosae an. Im Dünndarm verleihen die Muskelzüge dieser Schicht den Darmzotten die Motilität (Zottenpumpe) und grenzen die Mucosa morphologisch von der Submucosa ab (Weyrauch et al., 1998).

#### 4.1.2.2 Tela submucosa

Die aus lockerem Bindegewebe bestehende Submucosa stellt eine Verschiebeschicht für die Schleimhaut dar. Sie ist für den Abtransport von Nährstoffen verantwortlich und besitzt daher grössere Lymph- und Blutgefäße. Lymphozyten können hier in Einzellymphknötchen (*Noduli lymphatici solitarii*) oder aggregierten Lymphknötchen (Peyer-Plaques, *Noduli lymphatici aggregati*), wie typischerweise für das Ileum, organisiert sein (Liebich, 2003). Zudem enthält die Tela submucosa einen grösseren Nervenplexus (*Plexus submucosus* oder Meissner'scher Plexus), der mit dem Plexus myentericus (Auerbach'scher Plexus) zum enterischen Nervensystem gezählt wird (Salomon, 2005). Als Besonderheit weist das Duodenum die submukös eingelagerten Brunner'schen Drüsen (*Glandulae submucosae*) auf, die als Erkennungsmerkmal dieses Darmabschnittes dienen.

#### 4.1.2.3 Tunica muscularis

Die Tunica muscularis ist für das Durchmischen und Weiterbefördern des Speisebreis zuständig. Sie besteht aus einer inneren zirkulären Schicht (Stratum circulare) und einer äusseren longitudinalen Schicht glatter Muskulatur (Stratum longitudinale). Dazwischen liegt lockeres Bindegewebe mit dem Plexus myentericus (=Auerbach'scher Plexus) (Bucher und Wartenberg, 1989; Weyrauch et al., 1998).

#### 4.1.2.4 Tunica serosa

In den meisten Abschnitten des Rumpfdarmes schliesst die Tunica serosa den Wandbau nach Aussen hin ab. Sie besteht aus einem einschichtigen Plattenepithel (Mesothel) und dem darunter gelegenen Propriabindegewebe. Mancherorts findet man eine bindegewebige Tela subserosa, die als Verschiebeschicht dient. In coelomfreien Gebieten (retroperitonealer Abschnitt der Beckenhöhle) wird die Tunica muscularis durch eine Adventitia im umgebenden Gewebe verankert (Salomon, 2005).

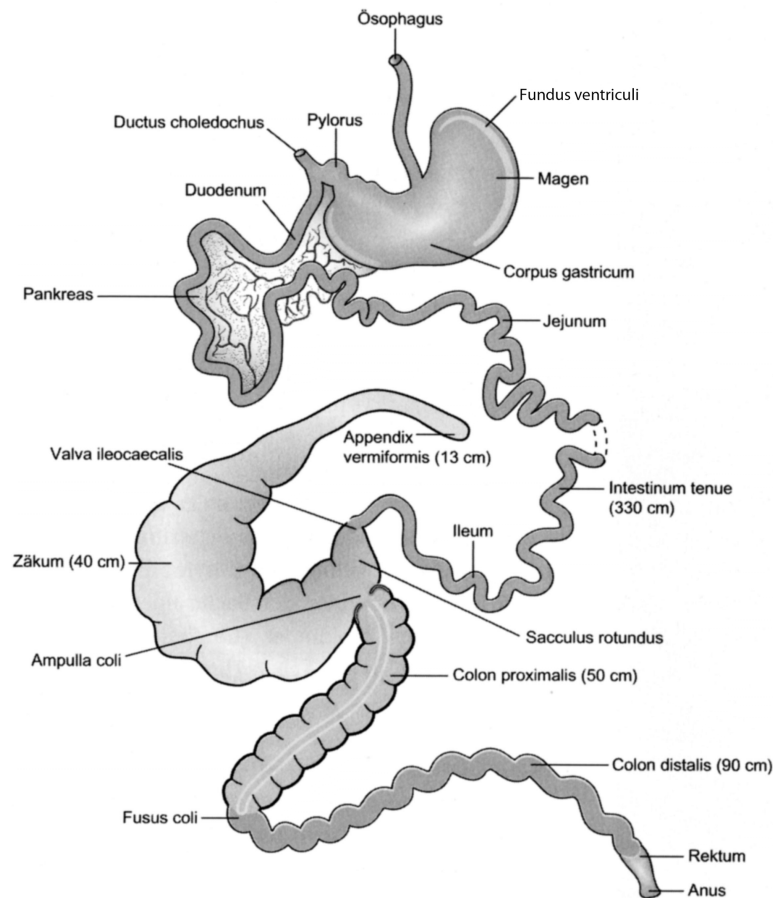
### 4.1.3 Physiologie des Magen-Darm-Traktes des Kaninchens

Der voluminöse Magen ermöglicht es dem Kaninchen, die geringere Nährstoffkonzentration rohfaserreicher Futtermittel durch die Aufnahme entsprechend grösserer Futtermengen teilweise auszugleichen (Schlölaut, 2003; O'Malley, 2008). Zudem sorgt die selektive Nahrungsaufnahme des Kaninchens für eine höher konzentrierte Nahrung (Cheeke, 1994; Harcourt-Brown, 1996; Harcourt-Brown, 2002). Im Gegensatz zum Wiederkäuer und Pferd, welche die ganze Pflanze fressen, wählt das Kaninchen die nahrhaftesten Pflanzenteile aus und bevorzugt ferner junge und saftige Pflanzen. Rohfaser wird vom Kaninchen in erster Linie zur Stimulation der Darmmotrik aufgenommen. Im Gegensatz zum Pferd, welches die strukturreiche Nahrung mehr als drei Tage mit sich trägt, scheidet das Kaninchen diese rasch wieder aus (O'Malley, 2008). Die Verdauungsvorgänge in Magen und Dünndarm sind ähnlich wie beim Monogastrier (Harcourt-Brown, 2002). Im Magen wird der zwischengelagerte Futterbrei unter der Einwirkung von Pepsin und Salzsäure verflüssigt und aufgeschlossen. Sekrete der Dünndarmschleimhaut, der Bauchspeicheldrüse und der Galle zerlegen den vorverdauten Nahrungsbrei mittels enzymatischer Spaltung weiter in seine Einzelbausteine (Schlölaut, 2003). Eiweisse, Fette und Kohlenhydrate werden zersetzt in Aminosäuren, Fettsäuren und Monosaccharide. Diese können dann, ebenso wie Wasser, Elektrolyte oder Vitamine, über die Darmschleimhaut resorbiert

werden (Scharrer und Wolfram, 2000). Der postprandiale pH-Wert im Magen kann stark absinken und sorgt für nahezu sterile Verhältnisse bevor der Verdauungsbrei in den Dünndarm gelangt (Harcourt-Brown, 2002). Aus endokrinen Zellen des Duodenums und Jejunums wird das Peptidhormon Motilin sezerniert, welches die Motilität des Dünndarms, Kolons und Rektums (nicht aber des Caecums) unterstützt. Die Motilin-Freisetzung wird durch faser- und fettreiche Nahrung stimuliert. Eiweissreiche und stärkereiche Nahrung hingegen hemmen die Sekretion und können zu Motilitätsproblemen im Gastrointestinaltrakt führen. Bei Hauskaninchen, welche einerseits mit einer hochkonzentrierten Diät und andererseits mit zu wenig Fasern für die Darmmotilität versorgt werden, besteht dadurch die Gefahr einer intestinalen Stase (O'Malley, 2008).

Wie alle Herbivoren ist auch das Kaninchen auf das Vorhandensein einer grossen Fermentationskammer angewiesen, damit der mikrobielle Abbau von Cellulose und Pflanzengerüstsubstanzen gewährleistet werden kann. Diese Gärkammern können entweder vor und/oder nach dem Dünndarm liegen. Demzufolge können Pflanzenfresser in Vormagenverdauung und Dickdarmverdauung eingeteilt werden. Je nachdem ob die mikrobielle Verdauung vorwiegend im Caecum oder im Colon abläuft, werden die Dickdarmverdauung als Caecum- oder Colonverdauung (u. a. Pferd) angesprochen. Beim Kaninchen benutzen die Bakterien den Blinddarm als Fermentationskammer (s. Abb.4). Zellulose und andere Kohlehydrate werden zu flüchtigen Fettsäuren abgebaut. Im Gegensatz zum Wiederkäuer ist beim Kaninchen das Fettsäuremuster unabhängig von der Futterzusammensetzung. Die prominente flüchtige Fettsäure beim Kaninchen ist Acetat, gefolgt von Butyrat und Propionat. Dies wird durch das Vorherrschen der Bacteroides spp. anstelle der Laktobazillen verursacht (O'Malley, 2008).

Der im Caecum erzeugte, leicht verdauliche und mit Vitaminen angereicherte Inhalt wird als Weichkot direkt vom After aufgenommen und erneut verdaut (s. Caecotrophie). Im Gegensatz zur Pansenfermentation beim Wiederkäuer ist dieser Vorgang aufgrund der kürzeren Verweilzeit im Verdauungstrakt weniger effizient hinsichtlich der Verdaulichkeit der Rohfaser (Schlölaut, 2003). Auch das Meerschweinchen, welches ebenfalls Caecotrophie zeigt, verdaut Fasern effizienter als das Kaninchen (O'Malley, 2008).



**Abb. 4:** Schematische Darstellung des Verdauungstraktes des Kaninchens (O'Malley, 2008).

#### 4.1.4 Caecotrophie

Das Kaninchen vermag zwei Kotarten unterschiedlicher Zusammensetzung zu bilden, die unabhängig voneinander ausgeschieden werden. Die Grundlage dieses Trennmechanismus liegt im proximalen Colon (CSM: Colonic Separation Mechanism), wo Flüssigkeit, feine Partikel und Bakterien mittels kontinuierlicher Antiperistaltik zurück ins Caecum transportiert werden (Sakaguchi, 2003). Gemäss O'Malley (2008) sind drei unterschiedliche Arten der Colonmotilität verantwortlich für die Bildung von weichem und hartem Kot. Diese werden unterstützt durch drei Poschenreihen und Tännien im proximalen Colon, die als Separationsstrecke dienen. Die Kolonspindel (Fusus coli) fungiert dabei als Schrittmacher für die weitere Passage der Ingesta und kontrolliert die Trennung von hartem und weichem Kot (O'Malley 2008). Die grösseren, wenig verdauten Futterpartikel gelangen in das Zentrum des Lumens des proximalen Colons, wo dem Chymus mit Hilfe der Darmperistaltik nochmals Wasser entzogen wird. Die nun geformten Hartkotballen werden rascher durch das Colon geschleust und bereits drei Stunden nach Futteraufnahme als unverdaulicher Rest ausgeschieden (Schlölaut 2003). Im Gegensatz zum Weich- oder Blinddarmkot wird dieser vom Kaninchen nicht gefressen.

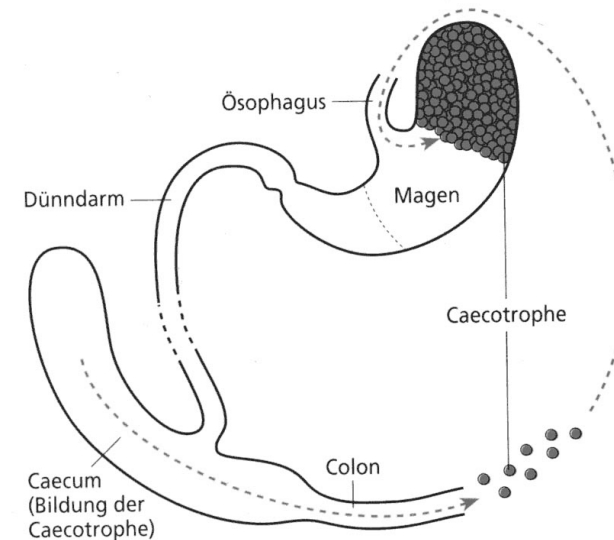
**Tabelle 1:** Zusammensetzung von normalem Kot und Blinddarmkot beim Kaninchen. (modifiziert nach Schley, 1985; Aus Niehaus 1975) (Nfe= Stickstofffreie Extraktstoffe)

Inhaltsstoffe (% TS)	normaler Kot	Blinddarmkot
Trockensubstanz	44,8	24,8
Wasser	53,8	75,2
Asche	14,2	15,7
Fett	2,6	1,4
Rohfaser	33,7	14,4
Roheiweiss	14,5	33,3
Nfe	34,8	35,1
Bakterienkeime	2700,0	9560,0

Der Anteil des nährstoffreichen Blinddarmkotes kann über 30% des gesamten Kotes ausmachen und ist aufgrund seiner traubenartigen und weicheren Struktur leicht von dem normalen, harten Kot zu unterscheiden. Die Caecotrophie wird durch das Kaninchen meist in der Nacht direkt vom Anus weg aufgenommen. Dieser Vorgang wird

vom Betrachter oft als normale Putzbewegung wahrgenommen. Der aufgenommene Blinddarmkot gelangt unzerkaut in den blindsackartig erweiterten Fundusteil des Magens (s. Abb.5). Die äussere, stark mit Bakterien angereicherte Schleimschicht des Blinddarmkots, die sich aus Mucoprotein und Vitamin B12 zusammensetzt, kann hier noch bis zu sechs Stunden erhalten bleiben. Währenddessen wirken bereits im Blinddarmkot enthaltene Bakterienfermente auf andere Nahrungsbestandteile ein, indem sie diese abbauen ehe die Bakterienmasse selbst aufgelöst und resorbiert wird (Schley, 1985). Bei der Verdauung der Caecotrophe im Dünndarm können die verloren geglaubten essentiellen Aminosäuren resorbiert und genutzt werden. Mit der Strategie der Caecotrophie vermag das Kaninchen das im Dickdarm gebildete, hochwertige mikrobielle Protein zu nutzen. Bei den meisten anderen Dickdarmverdauern geht dieses Protein weitgehend verloren, da in der Dickdarmmukosa kaum Transportsysteme für Aminosäuren vorhanden sind (Sakaguchi, 2003). Der Blinddarmkot sorgt zudem für eine gewisse Magenfüllung, wodurch der stetige Weitertransport des Chymus garantiert wird. Dies hilft dem Kaninchen bei unregelmässiger Nahrungszufuhr, wichtige physiologische und biochemische Prozesse in Gang zu halten (Breves et al., 2000). Ein weiterer Nutzen der Caecotrophie besteht darin, dass Kaninchen von der Zufuhr von Vitaminen des B-Komplexes, sowie von Vitamin K weitgehend unabhängig ist (Schlölaut, 2003).

Die Zusammensetzung der Nahrung scheint einen wesentlichen Einfluss auf die Caecotrophie zu haben. So ist bei einem geringen Protein- und Energiegehalt in der Nahrung die Koprophagie am ausgeprägtesten (O'Malley, 2008). Durch den Aufschluss der schwer verdaulichen Kohlenhydrate im Blinddarm entstehen flüchtige Fettsäuren. Mit Hilfe dieser Fettsäuren kann das Kaninchen 20-30% seines Energiebedarfs decken. Der mit dem Weichkot ausgeschiedene Anteil an flüchtigen Fettsäuren verleiht diesem zusätzlich einen charakteristischen Geruch, welcher das Kaninchen zum Fressen dieser Kotfraktion animiert (Schley, 1985). Zu viele leichtverdauliche Kohlenhydrate in der Nahrung können dem Kaninchen jedoch Probleme bereiten. Durch die Bildung von zu vielen flüchtigen Fettsäuren im Caecum sinkt der pH. Dies führt zur Hemmung der normalen Flora und ermöglicht pathogenen Keimen zu proliferieren (u.a. Clostridium spiroforme und E. coli), was zu lebensbedrohlichen Erkrankungen wie beispielsweise der Trommelsucht führen kann (O'Malley, 2008).



**Abb.5:** Bildung der Caecotrophe und deren Zwischenlagerung im Magen (Breves et al., 2000; modifiziert nach Harder, 1950).



## 4.2 Bedeutung und Regulation der Calcium-Homöostase

Calcium (Ca) liegt im Serum zu 55% als ionisiertes Calcium, zu 40% proteingebunden (davon zu 99% an Albumin oder an Globuline) und zu 5% in Verbindung mit organischen Säuren vor (Kraft et al., 2005). Die Bindung des Ca an Proteine ist stark pH-abhängig. Ein akuter Abfall des pH-Wertes im Blut verringert die Bindung und erhöht somit die Konzentration des biologisch aktiven Ca. Als einer der wichtigsten Mineralstoffe überhaupt ist Ca an einer Vielzahl von lebenswichtigen, biologischen Funktionen im Körper beteiligt. Abgesehen von der Bedeutung im Knochenstoffwechsel spielt das ionisierte Ca u. a. bei der Blutgerinnung, der präsynaptischen Ausschüttung von Neurotransmittern, der Muskelkontraktion, der Sekretionstätigkeit verschiedener Drüsen sowie der Enzymaktivierung eine wichtige Rolle. Calcium wird zu 99% in Knochen und Zähnen gespeichert und kann bei Bedarf teilweise mobilisiert werden. Dabei stellt der grösste Teil des Knochens ein langsam austauschbares Kompartiment dar (Kaune, 1999).

Die drei wichtigsten Regulatoren der Ca-Homöostase sind Parathormon (PTH), Calcitonin und Calcitriol (aktiver Metabolit des Vitamin D<sub>3</sub>). Ihre Wirkung richtet sich auf die klassischen Zielorgane Darm, Niere und Skelettsystem (s. Abb.6) (Kaune, 1999). Andere Hormone, wie beispielsweise Insulin, Sexualhormone und Thyroxine spielen eine untergeordnete Rolle. Die Regulationsmechanismen sorgen in der Regel dafür, dass die Serum-Ca-Konzentration bei den Säugern in engen Grenzen gehalten wird (2-3mmol/l). Beim Kaninchen allerdings kann diese stark schwanken und ist höher als bei den meisten anderen Spezies. Das hängt unter anderem damit zusammen, dass sich der Ca-Spiegel im Serum beim Kaninchen direkt proportional zum Ca-Spiegel in der Nahrung verhält. Die Ausscheidung von Ca geschieht im Gegensatz zu den meisten Säugetieren beim Kaninchen über den Urin (Eckermann-Ross, 2008). Auch andere Dickdarmverdauern, wie beispielsweise das Pferd oder das Meerschweinchen, weisen eine höhere Ca-Konzentration im Serum auf und scheiden überschüssiges Ca über den Urin aus (Liesegang et al., 2008).

PTH ist ein Peptidhormon, bestehend aus 84 Aminosäuren und wird aus den Hauptzellen der Nebenschilddrüse (Epithelkörperchen) sezerniert. Seine Hauptaufgabe besteht darin, eine Hypocalcämie zu verhindern (Kaune, 1999). Mit Hilfe eines membranständigen Calcium-sensing-Rezeptors können die Epithelkörperchen einen Abfall des Plasma-Ca-Spiegels detektieren und innert Sekunden das in Form von Sekretgranula gespeicherte PTH freisetzen (Brown und MacLeod, 2001). Durch

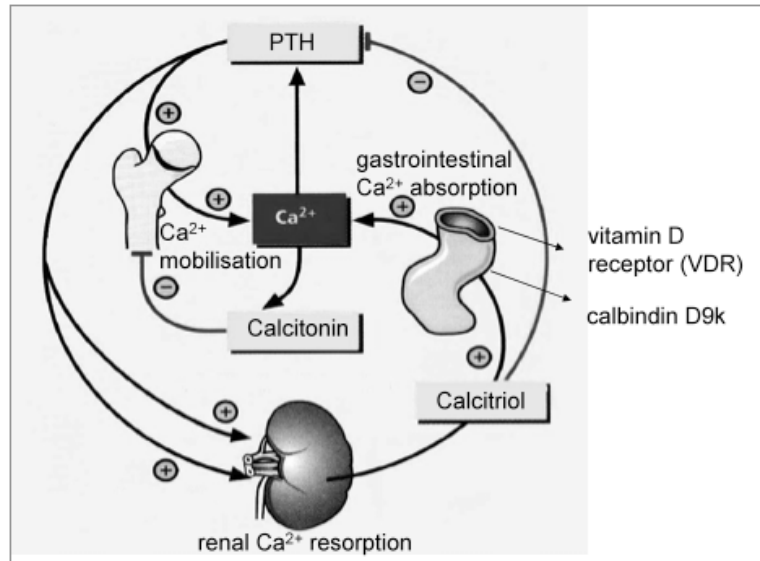
Osteoklastenaktivierung einerseits und Osteoblastenhemmung andererseits mobilisiert PTH Ca (und Phosphat) aus dem Knochen. In der Niere werden die tubuläre Ca-Rückresorption und die tubuläre P-Ausscheidung gesteigert.

Des weiteren intensiviert PTH die Aktivität der 1 $\alpha$ -Hydroxylase, dem Schlüsselenzym der Calcitriol-Synthese und fördert so indirekt die gastrointestinale Absorption von Ca (Kaune, 1999). Am Ende resultiert ein Anstieg der Serum-Ca-Konzentration, welche mittels Negativ-Feedback eine weitere PTH-Freisetzung unterdrückt.

Die Auslösung der PTH-Freisetzung erfolgt bei den meisten Spezies bei einem Absinken des Serum-Ca-Spiegels auf 1.2 mmol/L. Beim Kaninchen wird PTH bereits bei einem Abfall auf 1.7 mmol/L freigesetzt (Eckermann-Ross, 2008). Vermutlich können diese schnellen PTH-Änderungen die passive, von Vitamin D unabhängige Ca-Absorption im Darm anregen, indem die chemische Struktur der Tight Junctions verändert wird (Karbach, 1992).

Calcitonin (CT) ist ebenfalls ein Peptidhormon (32 Aminosäuren) und wird vorwiegend in den C-Zellen der Schilddrüse gebildet. CT wird bei einer Erhöhung des Plasma-Ca-Spiegels sezerniert. Es bewirkt eine vermehrte Ca-Einlagerung in den Knochen, indem die durch PTH geförderte Osteoklastentätigkeit einerseits gehemmt wird und andererseits die Osteoblastenproliferation gefördert wird. CT führt also zu einem Absinken des Blut-Ca-Spiegels und kann in Bezug auf den Ca-Metabolismus des Knochens als Antagonist zum PTH betrachtet werden (Kaune, 1999). Die Wirkung von CT auf die Nieren wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert. Am Darm sind keine direkten Effekte bekannt (Eckermann-Ross, 2008).

Calcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol bzw. 1,25(OH)<sub>2</sub>D) ist die biologisch aktive Form des Vitamin D und gehört zur Gruppe der Steroidhormone. Calcitriol wird in den Nieren aus 25-Hydroxycholecalciferol gebildet. Die Synthese wird u.a. durch PTH stimuliert. Calcitriol führt zu einem Anstieg von Ca und Phosphat im Plasma. Im Darm reguliert 1,25(OH)<sub>2</sub>D die drei Teilschritte der aktiven, transzellulären Ca-Resorption mittels Expression epithelialer Ca-Kanäle, cytosolischer Transportproteine (s. Calbindin) sowie der membranständigen Ca-ATPase. In der Niere fördert das Vitamin D-Hormon die Expression des Natrium-Ca-Austauschers und unterdrückt gleichzeitig die renale Ca-Exkretion (Hoenderop et al., 2005; Benn et al., 2008). Im Knochen fördert Calcitriol die Freisetzung von Ca, wobei die Vorgänge von der alimentären Ca-Aufnahme abhängig sind. Neben seiner Hauptfunktion bei der Regulation des Ca-Stoffwechsels ist Calcitriol auch an verschiedenen Prozessen der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung beteiligt (Dusso et al., 2005).



**Abb.6:** Ca-Homöostase (modifiziert nach Sidler-Lauff et al. 2009)

#### 4.2.1 Besonderheiten des Calciumstoffwechsels beim Kaninchen

Der Ca-Metabolismus des Kaninchens als Dickdarmverdauung (wie u. a. auch Pferd, Meerschweinchen und Hamster) weist im Vergleich zu dem der anderen Säugetiere einige Besonderheiten auf. So liegt die Ca-Konzentration im Serum beim Kaninchen um 30-50% höher als bei anderen Säugern und bewegt sich in weniger engen Bandbreiten (Eckermann-Ross, 2008). Die Ca-Absorption im Darm erfolgt beim Kaninchen nicht bedarfsorientiert, sondern ist abhängig vom Ca-Gehalt in der Nahrung. Versuche haben gezeigt, dass die Steigerung der Ca-Zufuhr beim adulten Kaninchen zu einem raschen Anstieg des Serumkalziums und zu einer Verminderung des Phosphorspiegels führen. Die für das Kaninchen spezifisch rasche PTH-Antwort kann dies vermutlich kontrollieren, indem die passive Ca-Absorption aus dem Darm via Strukturänderung der Tight junctions stimuliert wird (Karch, 1992; O'Malley, 2008). Übersteigt die Ca-Aufnahme den Bedarf, scheidet das Kaninchen überschüssiges Ca mit dem Harn aus (Schlölaut, 2003). Bei den meisten anderen Säugetieren wird überschüssiges Ca über den Darm eliminiert (O'Malley 2008). Andere Dickdarmverdauung wie das Pferd, der Hamster oder das Meerschweinchen weisen bezüglich der

renalen Ca-Exkretion Parallelen zum Kaninchen auf. Im Vergleich zur Ratte, bei der in einer Studie gezeigt wurde, dass bis zu 2% des in der Nahrung enthaltenen Ca über die Nieren eliminiert werden, kann dieser Wert beim Kaninchen bis zu 60% ansteigen (Cheeke und Amberg, 1973). Ohne signifikante Änderung des Harnvolumens kann beim Kaninchen die Ca-Konzentration von 1 bis auf 18 g/L ansteigen. Die forcierte Exkretion erklärt auch die besondere Disposition dieser Tierart zur Bildung und Ablagerung Ca-haltiger Harnkonkremente. Bei den Urolithen handelt es sich v.a. um Ca-Karbonat- und Ca-Oxalat-Steine (Burger, 2009). Die Ca-Exkretion über den Darmkanal spielt beim Kaninchen eine untergeordnete Rolle (Kamphues et al., 2004). Die gesteigerte renale Ca-Ausscheidung scheint gerade für Tiere mit ausgeprägter Koprophagie Sinn zu machen, da im Falle einer verstärkten fäkalen Exkretion ein Teil des Calciums erneut zur Elimination anfallen würde (Kamphues et al., 1985). Bei den meisten Säugetieren spielt der aktive Transportmechanismus bei der intestinalen Ca-Aufnahme eine wichtige Rolle (siehe 4.3). Dieser unterliegt hauptsächlich der Regulation durch das aktivierte Vitamin D-Hormon. Eine gesteigerte Calcitriol-Synthese führt zu einer erhöhten Ca-Aufnahme im Darm. Wie bereits erwähnt, scheint beim Kaninchen die rasche Ca-Resorption über den Darm von Vitamin D weitgehend unabhängig zu sein. Bei dieser Tierart überwiegt der passive, parazelluläre Transportweg durch die Darmwand, obwohl auch ein aktiver, Vitamin D-stimulierbarer Ca-Transport nachgewiesen wurde (Kamphues et al., 1985; de Vries de Heekelingen, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass bei einer übermäßigen Zufuhr von Ca in der Ration, die Ca-Absorption über den Darmtrakt im gleichen Verhältnis ansteigt. Das überschüssige Ca wird über den Urin ausgeschieden. Das ständige Wachstum der Zähne eines Kaninchens (2 - 2,4 mm/Woche) verlangt einen hohen Bedarf an Ca, welcher durch die effiziente Ca-Absorption gedeckt wird (Eckermann-Ross, 2008).

### 4.3 Mechanismen der gastrointestinalen Calciumabsorption

Der aktuelle Kenntnisstand über die gastrointestinale Ca-Absorption basiert hauptsächlich auf Untersuchungen an Monogastriern und Wiederkäuern. Das mit dem Futter aufgenommene Ca kann entweder durch passive Diffusion oder mittels aktivem transzellulärem Mechanismus durch die Darmmukosa transportiert werden. Einige Studien beschreiben, dass der passive Transportmechanismus über den gesamten Darmtrakt erfolgt, während sich der aktive Transport vorwiegend auf das Duodenum und das vordere Jejunum beschränkt (Hoenderop et al., 2005). Beim Kaninchen überwiegt der passive Transport. Der aktive Transport kommt erst bei einer knappen Ca-Versorgung zum Tragen (Eckermann-Ross, 2008). Die Ca-Absorption im Darmtrakt wird auch durch das Ca:P-Verhältnis der Ration beeinflusst (Kamphues, 2004). Ca wird im Magendarmtrakt aber nicht nur absorbiert, sondern auch über die ganze Länge der Darmmukosa sezerniert. Man spricht von einem bidirektionalen Ca-Transport durch das Darmepithel. Beim Kaninchen konnten Itoh und Hatano (1960) im Dünndarm und im Caecum eine endogene Sekretion von Ca nachweisen. Einige Studien beschreiben, dass der passive Transportmechanismus eher im distalen Bereich des Jejunums sowie im Ileum stattfindet, während der aktive Transport im Duodenum und im vorderen Jejunum abläuft (Breves und Schröder, 2005).

#### 4.3.1 Passiver parazellulärer Calciumtransport

Der parazelluläre Calciumtransport ist bei einer ausreichenden Ca-Zufuhr vorherrschend und verläuft über die Tight junctions. Dabei gelangt das mit dem Futter aufgenommene Ca durch passive Diffusion parazellulär entlang eines chemischen Gradienten in die Blutbahn. Die passive, parazelluläre Ca-Absorption stellt einen nicht sättigbaren Transportmechanismus dar und ist keiner direkten Regulation unterlegen. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass Calcitriol die chemische Struktur von Tight junctions zu variieren vermag und somit der parazelluläre Transportweg indirekt stimuliert werden würde (Karbach, 1992).

#### 4.3.2 Aktiver transzellulärer Calciumtransport

Die Bioverfügbarkeit von Ca im Futter beeinflusst die Effizienz der Ca-Absorption im Darm. So stellt sich der aktive transzelluläre Calciumtransport vorwiegend bei tiefen Calciumverhältnissen ein. Es handelt sich dabei um einen sättigbaren Mechanismus, welcher hauptsächlich der Kontrolle des Vitamin D-Hormons Calcitriol unterliegt

(Perez et al., 2008). Die Bindung von Calcitriol an den kernständigen Vitamin D-Rezeptor (VDR) induziert die Synthese von Ca-Transportkomponenten. Ein Absinken der Serum-Calcium-Konzentration stimuliert die Freisetzung von PTH, welches seinerseits die Umwandlung des inerten 25-Dihydroxyvitamin D in das aktive 1,25-Dihydroxyvitamin D fördert. Calcitriol wiederum aktiviert die Synthese von Calbindin D9k (Cb-D9k), dem intrazellulären Transportprotein für Calcium. Die sehr komplexe, metabolisch angetriebene Calciumbewegung durch die Enterozyten lässt sich in drei Teilschritte unterteilen (s.Abb. 7):

#### 1. Ca-Einstrom via apikaler Bürstensaummembran der Enterozyten

Da im Zytoplasma der Enterozyten des Zottenepithels die Konzentration an freiem Calcium sehr gering ist ( $<1\mu\text{mol/l}$ ), gelangt das Calcium entlang eines elektrochemischen Gradienten vorerst passiv durch zwei spezifische epitheliale Ca-Kanäle in das Zytosol. Bei den in der Bürstensaummembran liegenden Kanälen handelt es sich um die Kanäle TRPV5 (ehemals ECaC1 oder CaT2) und TRPV6 (ehemals ECaC2 oder CaT1). Die beiden Kanäle gehören zur Vanilloid-Rezeptor-Unterfamilie der TRP-Kanäle (englisch: transient receptor potential). TRPV5 wurde ursprünglich beim Kaninchen in Plazenta, Niere und Dünndarm entdeckt (Hoenderop et al., 1999). Praktisch zeitgleich konnte im Darm der Ratte TRPV6 nachgewiesen werden (Peng et al., 1999). TRPV5 ist vorwiegend in der Niere für die Rückresorption von Calcium verantwortlich, während TRPV6 hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt seine Funktion als Transportkanal ausübt. Die Expression beider Kanäle wird in erster Linie durch Calcitriol reguliert. Für die Öffnung der TRPV-Kanäle sind der zugehörige, spezifische und intrazellulär gelegene VDR, sowie der extrazelluläre pH-Wert und die intrazelluläre Ca-Konzentration verantwortlich. Erst kürzlich konnten diverse Kanal-assoziierte Proteine identifiziert werden, denen eine wichtige Rolle zur Stimulation der biologischen Aktivität von TRPV5/6 zugeschrieben wird (van de Graaf et al., 2006). Es wird vermutet, dass die beiden TRPV-Kanäle den limitierenden Faktor bei der transzellulären Ca-Absorption darstellen (Nijenhuis et al., 2005).

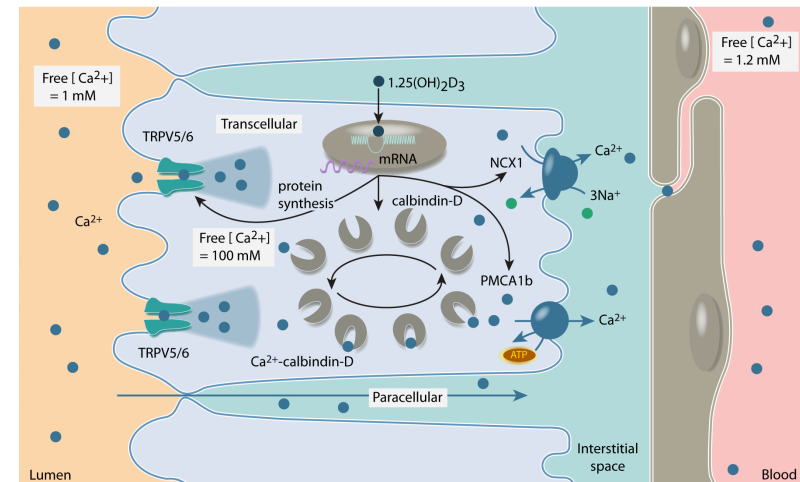
#### 2. Transport durch das Cytosol mittels reversibler Bindung an Calbindin $D_{9k}$

Freie Ca-Ionen in der Zelle spielen als Second-Messenger für viele Zellfunktionen eine wichtige Rolle. Darum ist es von zentraler Bedeutung, dass die Konzentration an freien Ca-Ionen nicht über einen bestimmten Wert hinaus ansteigt. Durch die reversible Bindung des Calciums an Ca-bindende Proteine (CaBP) wird dem entgegengewirkt. So wird das gebundene Calcium von der apikalen zur basalen Seite des Enterozyten transportiert. Dieser Prozess wird wiederum von Calcitriol gesteuert.

Calbindin fungiert also einerseits als Shuttleprotein für Ca durch die Darmzelle und andererseits als cytosolischer und nukleärer Ca-Puffer. Bis jetzt konnten in Tieren zwei verschiedene CaBP identifiziert werden: Das bei Säugern vorwiegend in Gastrointestinaltrakt und Niere vorkommende Cb-D9k, sowie Cb-D28k, welches im Darm von Vögeln und auch in Darm, Niere, Gehirn, Uterus und Pankreas von Säugern zu finden ist (siehe 4.5).

### 3. Ca-Ausschleusung über die basolaterale Membran

Die Ausschleusung von Ca an der basolateralen Enterozytenmembran wird einerseits durch die Ca-ATPase (PMCA<sub>1b</sub>) und andererseits durch den Na/Ca-Austauscher (NCX1) vermittelt. Es wurde nachgewiesen, dass im Darmepithel die Zottenspitze eine höhere Expressions- und Aktivitätsrate der Ca-ATPase gegenüber der Zottenbasis aufweist. Calbindin wurde auch hauptsächlich in adulten Enterozyten entdeckt. Dies unterstützt die Annahme, dass reife Enterozyten die höchste Kapazität für die transcelluläre Ca-Bewegung aufweisen. Der Na/Ca-Austauscher ist für etwa 20% der Ca-Ausschleusung auf der basolateralen Seite zuständig. NCX1 wurde in Ratten, Mäusen und Hühnern gefunden. Der Nachweis beim Kaninchen hingegen steht noch aus (Perez et al., 2008). Die Aktivität der Ca-Pumpe wird durch Vitamin D gesteigert. Studien haben gezeigt, dass in erster Linie PMCA<sub>1b</sub> für die intestinale Ca-Ausschleusung auf der basolateralen Seite verantwortlich ist. Für die positive Stimulation dieser Ca-ATPase ist wiederum 1,25(OH)<sub>2</sub>D verantwortlich (Hoenderop et al., 2005).



**Abb. 7:** Vergleich zwischen der aktiven transzellulären und der passiven parazellulären Absorption von Calcium im Darm (Hoenderop et al., 2005).

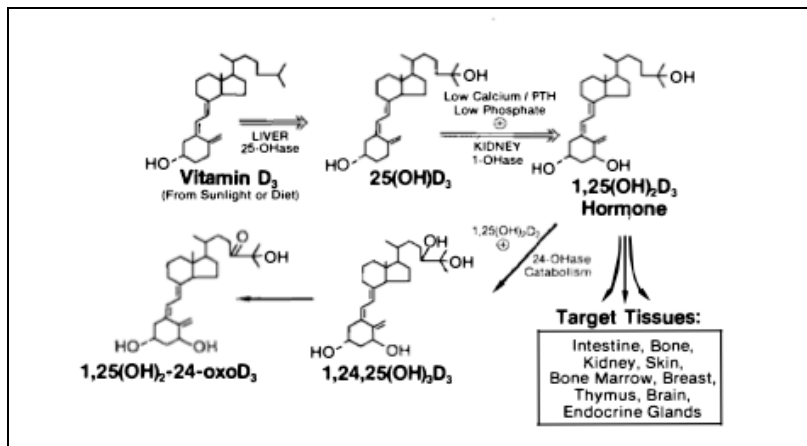
TRPV = apikaler Ca-Kanal; PMCA1 = Plasmamembran-Ca-ATPase;  
NCX1 = Na/Ca-Austauscher

## 4.4 Regulation des epithelialen Ca-Transports

### 4.4.1 Vitamin D

Es ist allgemein bekannt, dass Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) einer der Hauptregulatoren der Calciumhomöostase darstellt. Vitamin D<sub>3</sub> und Vitamin D<sub>2</sub> (Ergocalciferol) stellen die wichtigsten Metaboliten der fettlöslichen D-Vitamine dar. Beide Formen sind den Secosteroiden zuzuordnen und können in der Zelle durch die Bindung an spezifische Rezeptoren die Genexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren beeinflussen (von Engelhardt und Breves, 2000). Vitamin D<sub>2</sub> und seine Vorstufe Ergosterol kommen in Pflanzen und Mikroorganismen vor. Vitamin D<sub>3</sub> und seine Vorstufe 7-Dehydrocholesterol sind in tierischen Produkten zu finden. Unter dem Einfluss von Sonnenlicht (UV-Strahlen der Wellenlänge 280-320nm) und anschließender Thermoisomerisierung wird 7-Dehydrocholesterol im Stratum spinosum und Stratum basale der Haut zu Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>) umgewandelt. Gebunden an Plasmaproteine (Vitamin-D-Bindungsproteine, DBP) gelangt das Vitamin D<sub>3</sub> über die Blutbahn zur Leber und wird in einem ersten Hydroxylierungsschritt zum 25-Hydroxycholecalciferol (25(OH)-D<sub>3</sub>). In der Niere wird 25(OH)-D<sub>3</sub> weiter zu dem biologisch

aktiven Calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ ) hydroxyliert. Das direkt mit der Nahrung aufgenommene Vitamin D durchläuft dieselben Hydroxylierungsschritte (Abb.4). Im Gegensatz zu der 25-Hydroxylase der Leber ist die Aktivität der  $1\alpha$ -Hydroxylase in der Niere strengen Regulationsmechanismen unterlegen. Tiefe Ca- und P-Werte im Blut sowie PTH stimulieren die Aktivität der  $1\alpha$ -Hydroxylase, während diese durch Calcitriol selbst gehemmt wird (Dusso et al., 2005). Etwa 5% des lipophilen  $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$  ist ungebunden und gelangt mittels einfacher Diffusion in die Zielzelle und verbindet sich dort mit dem Vitamin-D-Rezeptor (VDR). Die anschließende Phosphorylierung dieses Hormon/Rezeptor-Komplexes hat die Transkription verschiedener calcitriolabhängiger Gene zur Folge. Dies führt zu einer erhöhten Syntheserate von Proteinen, die vorwiegend für die Erhaltung der Ca-Homöostase in den klassischen Zielgeweben Darm, Niere und Knochen verantwortlich sind (z.B. Calbindin, TRPV5/6, alkalische Phosphatase, 24-Hydroxylase, Osteocalcin, Ca-ATPase und VDR) (Haussler et al., 1995).



**Abb. 8:** Hepatische und renale Aktivierungsschritte von Vitamin  $\text{D}_3$  zum Calcitriol. Tiefe Ca- und P-Werte im Blut aktivieren das Enzym  $1\alpha$ -Hydroxylase (Haussler, 1986).

#### 4.4.2 Vitamin D-Rezeptor

Durch die Bindung an den spezifischen Vitamin D-Rezeptor (VDR) wird die genomische Wirkung von Calcitriol induziert. Der VDR gehört zur Familie der Steroidhormonrezeptoren und fungiert so als ligand-aktiver Transkriptionsfaktor. Nebst dem kernständigen VDR ( $\text{VDR}_{\text{nuc}}$ ) kommen VDRs auch in den Caveolae der Zellmembran vor ( $\text{VDR}_{\text{mem}}$ ) (Norman, 2006). Durch das Vermögen von  $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$  unterschiedliche Konformationen anzunehmen, wird entweder  $\text{VDR}_{\text{nuc}}$  oder  $\text{VDR}_{\text{mem}}$  aktiviert.  $\text{VDR}_{\text{nuc}}$  wird durch die 6-s-trans- $1,25$ -dihydroxy-Vitamin-D-Form stimuliert. Dies aktiviert die Transkription der Gene vitamin-D-abhängiger Proteine. Im Darm bedeutet dies eine gesteigerte Expression des cytosolischen Transportproteins Cb-D9k, der epithelialen Calcium-Kanäle TRPV5 und 6, sowie der membranständigen Ca-ATPase PMCA. Die 6-s-cis-Form des Calcitriols lagert sich an den  $\text{VDR}_{\text{mem}}$  und hat die Aktivierung unterschiedlicher Enzyme zur Folge (Norman, 2006). Der Reaktionsweg über den  $\text{VDR}_{\text{mem}}$  wird als schneller Reaktionsweg definiert (rapid response, RR; Sekunden bis Minuten), während die Stimulation des  $\text{VDR}_{\text{nuc}}$  einen langsamen Prozess darstellt (genomic response; 60 Minuten bis Stunden) (Norman, 2006).

Mittlerweile ist bekannt, dass das Molekulargewicht des VDR verschiedener Tierarten zwischen 48 bis 60 kDa liegt. Als Bestandteil des Calcitriol-endokrinen-Systems umfasst die Wirkung des VDR nicht nur die klassischen Zielorgane Darm, Niere und Knochen. Studien haben gezeigt, dass der VDR in nahezu allen Körperzellen exprimiert werden kann. Selbst in Tumorzellen konnte der VDR nachgewiesen werden (Bouillon et al., 2006).

## 4.5 Calbindin

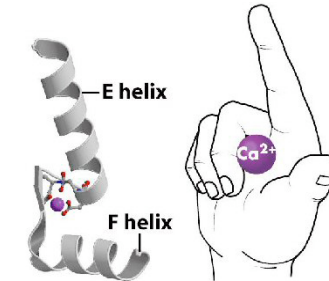
### 4.5.1 Lokalisation, Molekulargewicht und Vorkommen

Calbindine sind intrazellulär vorkommende Ca-bindende Proteine (CaBP), die eine sehr hohe Affinität zu Calcium aufweisen ( $K_d = 10^{-8}$  bis  $10^{-6}$ ). Ebenfalls zu dieser Proteinfamilie gehören Calmodulin, Parvalbumin und Troponin welche vorwiegend in der Muskulatur vorkommen (Van Eldik et al., 1982). 1966 gelang es Wasserman, Taylor und Kallfelz erstmals das Vitamin D-abhängige CaBP Calbindin D28k (Cb-D28k) im Hühnerdarm nachzuweisen. Die Nomenklatur bezieht sich auf die Molekulargröße (28kDa) des Proteins (Wasserman et al., 1966). Da Cb-D28k auch im distalen Nierenkonvolut von Amphibien und Reptilien gefunden wurde, wird angenommen, dass es sich um ein phylogenetisch altes Protein handelt (Parmentier et al., 1987). Cb-D28k ist im Darm von Vögeln nachweisbar, kommt aber auch bei Säugetieren, hauptsächlich in Niere und Gehirn vor. Kurze Zeit nach der Entdeckung von Cb-D28k wurde in der Darmschleimhaut der Ratte das Calbindin D9k (Cb-D9k) entdeckt (Kallfelz et al., 1967). Cb-D9k, welches mit einem Molekulargewicht von 9 kDa zu den kleinsten CaBP gehört, findet man vorwiegend in Darm und Niere von Säugetieren. Neben den am Ca-Stoffwechsel beteiligten Geweben (Darm, Niere, Knochen), wurde Calbindin u. a. auch in Plazenta, Uterus, Pankreas, Gehirn, Lunge, Innenohr und Retina gefunden. Es wird vermutet, dass Calbindin ursprünglich ein neuronales Protein war. Sein Vorkommen in all den anderen Geweben spiegelt die Entwicklung höherer Spezies wider (Parmentier et al., 1987). Die genaue Funktion von Calbindin in diesen Geweben ist bislang wenig erforscht. Studien haben gezeigt, dass Calcitriol bei der Transkription von Cb-D9k und Cb-D28k wichtige regulatorische Funktionen einnimmt (Li et al., 2001).

### 4.5.2 Struktur und Funktion von Calbindin D9k

Allen CaBP ist eine oktaedrisch angeordnete Ca-bindende Struktur gemein. Diese wird durch eine spezielle Helix-Loop-Helix-Anordnung der Polypeptidketten gebildet (sogenannte EF-Hand). Die aus einem bestimmten Aminosäure-Motiv bestehende Ca-Bindungsdomäne wurde erstmalig beim Parvalbumin entdeckt. Eine Schleife aus 12 Aminosäuren entspricht der Ca-bindenden Struktur, welche die beiden  $\alpha$ -Helices E und F verbindet. Bildlich lässt sich die Anordnung mit einer rechten Hand mit ausgestrecktem Zeigefinger und Daumen vergleichen. Dabei entspricht der Zeigefinger der N-terminalen E-Helix und der Daumen der C-terminalen F-Helix. Die gebeugten

Mittelfinger lassen sich mit der Aminosäure-Schleife vergleichen (Abb. 5). Bindet Ca an die Schleife, erfährt das Protein eine Konformationsänderung (Christakos et al., 1989).



**Abb.9:** Helix-Loop-Helix-Anordnung der Polypeptidketten und EF-Hand (Chemistry, 2009).

Cb-D9k und Cb-D28k sind sich strukturell sehr ähnlich. Beide sind hitzestabil, besitzen einen isoelektrischen Punkt bei  $pH \approx 4,7$  und sind – ausser beispielsweise in Gehirn und Plazenta – Vitamin D-abhängig (Hunziker und Schrickel, 1988; Christakos et al., 1989). Mit einer Polypeptidkette aus 78 Aminosäuren und vier Haupthelices besitzt Cb-D9k zwei EF-Hände. Das grössere Cb-D28k hatte ursprünglich sogar sechs EF-Hände. Im Laufe der Evolution haben jedoch zwei ihre starke Bindungsaffinität zum Calcium verloren (Hunziker und Schrickel, 1988; Christakos et al., 1989). Es ist wichtig zu erwähnen, dass trotz der strukturellen Ähnlichkeit zwischen Cb-D9k und Cb-D28k keine Sequenzhomologie besteht. Antikörper, die gegen Cb-D9k oder Cb-D28k gerichtet sind, gehen weder Kreuzreaktionen untereinander noch mit anderen CaBP ein (Christakos et al., 1989).

Trotz vieler Studien ist die Funktion von Calbindin innerhalb des Ca-Haushaltes noch nicht vollständig geklärt. Es ist aber bekannt, dass Calbindin im Darm (Cb-D9k bei Säugetieren, Cb-D28k bei Vögeln) und in der Niere (Cb-D28k) für den Ca-Transport durch das Cytosol verantwortlich ist (Christakos et al., 2003). In der Studie von Sooy konnte gezeigt werden, dass Cb-D28k durch die Regulation des intrazellulären Ca an der Freigabe von Insulin beteiligt ist (Sooy et al., 1999). Cb-D28k soll auch verschiedene Zelltypen vor Apoptose schützen, indem es die calciuminduzierte Schädigung der Mitochondrien verhindert. Dadurch wird die Abgabe des Cytochroms C verhin-

dert, welches als Auslöser für den induzierten Zelltod verantwortlich sein soll (Christakos et al., 2003).

Allgemein lassen sich CaBP funktionell in Puffer und Sensoren einteilen. Mit der Aufgabe als Puffer, wie sie beispielsweise Parvalbumin wahrnimmt, wird gewährleistet, dass die Konzentration freier intrazellulärer Ca-Ionen nicht über einen bestimmten Wert hinaus ansteigt. Diese wichtige Funktion dient dem allgemeinen Zellschutz. Calmodulin, als sensorisches CaBP, greift als aktiver Regler in Second-messenger-Systeme ein. Durch die direkte Modulation Ca-abhängiger Signalkaskaden beeinflusst dieses CaBP eine Vielzahl wichtiger Zellfunktionen (Fullmer und Wasserman, 1981). Da im vorliegenden Projekt das Vorkommen von Cb-D9k im Kaninchendarm untersucht wurde, wird nachfolgend hauptsächlich auf Forschungsergebnisse bezüglich des Cb-D9k im Darm eingegangen. Durch die Bindung von Ca vermag Cb-D9k gleichzeitig die Funktion als Shuttleprotein und die des zytosolischen Puffers auszuüben. Die Genexpression von Cb-D9k im Darm wird durch die Bindung von  $1,25(\text{OH})_2\text{-D}$  an den  $\text{VDR}_{\text{nuc}}$  mit anschliessender Komplexbildung aktiviert. Studien an Ratten haben gezeigt, dass der aktive Ca-Transport bei dieser Spezies vorwiegend im Duodenum und im vorderen Jejunum abläuft. Dies hängt wahrscheinlich mit der Verweilzeit des Chymus zusammen. Je kürzer diese ist (weniger als 2% im Duodenum), desto eher wird der aktive, transzelluläre Ca-Absorptionsweg angetrieben. Bei einer calciumreichen Diät wird der grösste Teil des Calciums passiv resorbiert. Dies findet vor allem im distalen Bereich des Jejunums und im Ileum statt (Marcus und Lengemann, 1962). Die beim Kaninchen überwiegende passive Diffusion findet hauptsächlich im Dünndarm statt (Kamphues et al., 1985). Wiener et al. (1990) konnten beim Kaninchen auch eine geringe Ca-Absorption im distalen Colon nachweisen. Die Schleimhülle der Caecotrophe verhindert dort einen grösseren Anteil der Ionen an der Diffusion.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Versuchstiere

24 Tiere (Rasse Weisse Neuseeländer-Hybriden) aus einer Mastkaninchenzucht wurden vor der Schlachtung folgendermassen aufgestellt: In vier verschiedenen Fütterungsgruppen wurden die Kaninchen über fünf Monate gemischtgeschlechtlich gehalten. Bei ihrer Einstellung waren die Tiere fünf bis sechs Wochen alt. Futter und Wasser wurden ad libitum zur Verfügung gestellt.

Folgende Fütterungsgruppen wurden gebildet:

- |              |                             |
|--------------|-----------------------------|
| 1. Gruppe L  | = Luzernemehl               |
| 2. Gruppe G  | = Grasmehl                  |
| 3. Gruppe LG | = Luzerne- und Getreidemehl |
| 4. Gruppe GG | = Gras- und Getreidemehl    |

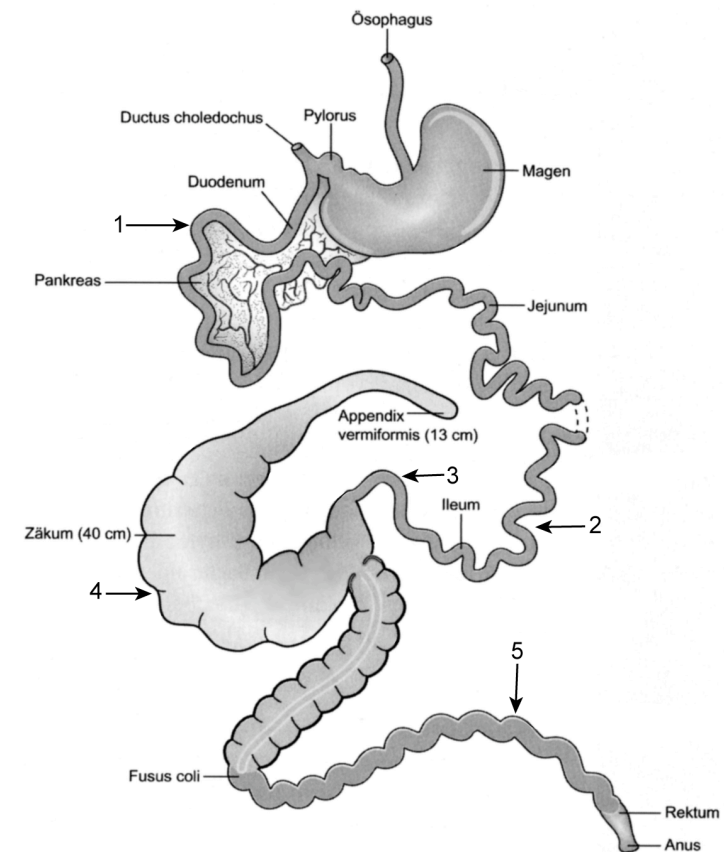
Die vier pelletierten Futtermittel wurden von der Firma Provimi-Kliba SA in Kaiseraugst speziell für diesen Fütterungsversuch hergestellt. Die Analyse der Futtermittel wurde im Labor des Institutes für Tierernährung der Vetsuisse Fakultät Universität Zürich vorgenommen (Tab.1). Dabei fiel auf, dass die Ca:P-Verhältnisse der Gruppen G und GG praktisch identisch waren.

**Tabelle 2:** Analyse der Zusammensetzung der vier Futterpellets in % TS sowie J/g TS (Labor des Institutes für Tierernährung der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich).

Rohstoff		L	G	LG	GG
Trockensubstanz	%	90,4	89,5	84,4	90,8
Rohprotein	%	16,4	18,1	14,6	13,5
Rohfett	%	1,9	4,0	3,5	5,1
Rohasche	%	12,4	14,6	8,1	9,1
Rohfaser	%	29,0	19,0	19,1	13,4
NfE	%	40,0	44,1	54,5	58,7
OS	%	85,5	85,3	91,8	90,8
NDF	%	46,3	45,8	38,2	33,3
ADF	%	32,7	23,3	20,9	18,1
ADL	%	8,8	4,1	4,9	3,8
HC	%	13,6	22,5	17,2	15,2
C	%	23,8	19,1	15,9	14,2
HCluA	%	0,46	2,92	0,60	1,74
Bruttoenergie	J/g	17763	17589	18372	18136
Calcium	%	2,32	1,04	1,36	0,83
Phosphor	%	0,28	0,54	0,35	0,46
Magnesium	%	0,21	0,27	0,19	0,25
Ca:P-Verhältnis		8,00	1,91	3,82	1,79

L = Luzerne; G = Gras; LG = Luzerne & Getreide; GG = Grasmehl & Getreide

Die Tiere wurden im Alter von sieben Monaten getötet. Nach der Tötung der Tiere erfolgte die Sektion. Der Gastrointestinal-Trakt wurde dabei in toto entnommen und der Darminhalt entfernt. Bei jedem Kaninchen wurde nachfolgend aus fünf verschiedenen Darmabschnitten - Duodenum, Jejunum, Ileum, Caecumkörper und Colon - eine 1-4 cm lange Darmprobe entnommen (Abb.10). Die Darmproben wurden sofort in 4%iges, neutral gepuffertes Formalin gelegt und für 24 Stunden darin fixiert.



**Abb. 10:** Schematische Darstellung des Magen-Darm-Traktes beim Kaninchen und die Lokalisationen (1-5) der entnommenen Darmabschnitte für den immunhistochemischen Nachweis des VDR (modifiziert nach O'Malley, 2005). Probeentnahmestellen im Duodenum (1), Jejunum (2), Ileum (3), Caecum (4) und Colon (5).



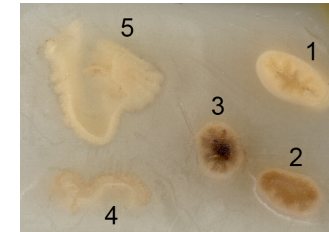
Nach der Fixierung wurden die Proben gewässert, in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Einbettkassetten (Jet Kassetten®, Leica Nussloch, D) verbracht. Die anschliessende Einbettung in Paraffinblöcke wurde maschinell mittels Paraffinausgiessstation (EG1160®, Leica, Nussloch, D) durchgeführt (s. Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Protokoll der Entwässerung und Infiltration der Gewebeproben mit Paraffin.

Dauer	Reagens
4h	70% Alkohol
4h	70% Alkohol
4h	96% Alkohol
4h	96% Alkohol
4h	100% Alkohol
4h	100% Alkohol
4h	Methylbenzoat
4h	Methylbenzoat
4h	Xylol
4h	Xylol
4h	Paraffin
4h	Paraffin

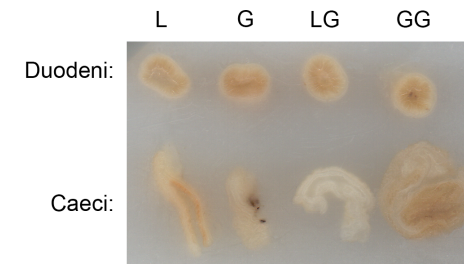
## 5.2 Aufarbeitung des Probenmaterials

Für die Immunhistochemie sollten einerseits alle fünf Darmabschnitte eines Tieres in Abhängigkeit von der Fütterung verglichen werden und andererseits die Caeci und Duodeni der vier verschiedenen Fütterungsgruppen einander gegenübergestellt werden. In einem ersten Schritt wurde das vorhandene Versuchsmaterial erneut eingeschmolzen. Hierfür wurde das Probenmaterial während 3-4 Stunden bei einer Temperatur von 60° Grad in einen Trockenschrank gelegt (BINDER FD 115, BINDER GmbH, Tuttlingen D). Für den Vergleich der Darmabschnitte wurden anschliessend die je fünf Darmproben eines Kaninchens in Einbetterschälchen aus Edelstahl mit der Querschnittsfläche nach unten angeordnet. An der Paraffinausgiessstation (EG1160, Leica, Nussloch, D) wurden dann 3 x 2 x 2 cm grosse Paraffinblöcke gegossen (Abb. 11a).



**Abb. 11a:** Beispiel eines Paraffinblocks für den Vergleich der fünf Darmabschnitte (1 Duodenum, 2 Jejunum, 3 Ileum, 4 Caecum, 5 Colon) eines Kaninchens.

Für den Vergleich der Fütterungsgruppen wurden die vom Paraffin befreiten Organproben in einer selbstgestalteten Einbettvorrichtung aus Chromstahl-Platten und Alufolie positioniert. Hierfür wurden von jeder der vier Fütterungsgruppen jeweils das Duodenum und das Caecum desselben Tieres verwendet. Anschliessend wurden an der Paraffinausgiessstation 4.5 x 3 x 2.5 cm grosse Paraffinblöcke hergestellt (Abb. 11b). Alle Paraffinblöcke wurden bei 4° C aufbewahrt.



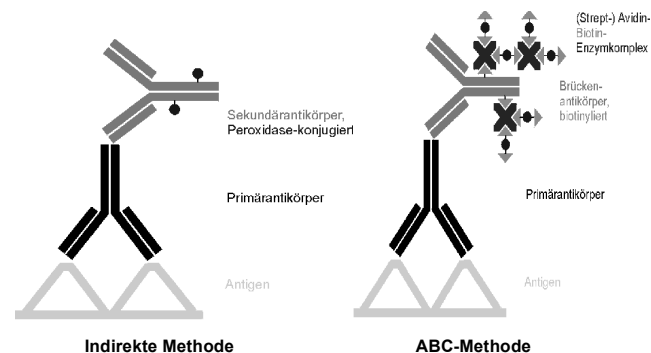
**Abb. 11b:** Beispiel eines Paraffinblocks für den Vergleich der vier Fütterungsgruppen. Je eine Darmprobe von Duodenum und Caecum von einem Tier aus jeder Fütterungsgruppe (L = Luzernemehl, G = Grasmehl, LG = Luzerne- und Getreidemehl, GG = Gras- und Getreidemehl).

### 5.3 Histologie

Für die histologischen Färbungen wurden 4µm dicke Paraffinschnitte mittels Rotationsmikrotom (Leica, RM 2165, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, D) angefertigt und im Folgenden auf permanent positiv geladene Objektträger (Super-Frost® Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig, D) aufgetragen. Die Trocknung fand bei 37° C während etwa 20 Stunden im Wärmeschrank (BE 400/3 TWW, Memmert GmbH, Schwabach, D) statt. In einem ersten Schritt erfolgte die Färbung der Schnitte nach HE (Hämatoxylin-Eosin). So konnte jeder angefertigte Schnitt hinsichtlich der Integrität der Darmwand beurteilt werden. Anschliessend wurde die Immunhistochemie durchgeführt.

### 5.4 Immunhistochemische Methode für Calbindin D9k

Für den immunhistochemischen Nachweis von Calbindin D9k (Cb-D9k) wurde auf die sogenannte StreptABC-Methode zurückgegriffen. Die ABC-Methode (StreptAvidin-Biotin-Complex) stellt eine Variation der indirekten immunhistochemischen Methode dar (s. Abb.12).



**Abb.12:** Indirekte immunhistochemische Methoden

Nebst dem spezifisch gegen das Antigen gerichteten Primärantikörper wird ein biotinylierter Sekundärantikörper eingesetzt. Biotin gehört zu den wasserlöslichen Vitaminen (Vitamin H), bindet sehr gut an den Brückenantikörper und ist auch mit Enzymen markiert (z.B. Merrettichperoxidase). Das Glykoprotein Streptavidin wurde

gentechnologisch hergestellt und stammt aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii*. Avidin besitzt vier Bindungsstellen, wovon jeweils drei mit Biotin einen makromolekularen Komplex eingehen. Die freie Biotinbindungsstelle koppelt an den Sekundärantikörper und kann so für die Farbreaktion wichtige Enzyme in unmittelbare Nähe zu den Antigenen bringen. Avidin/Biotin-Bindungen sind rund eine Million mal stärker als andere Antigen/Antikörper-Bindungen. Durch die aussergewöhnlich starke Bindungskapazität und Affinität von Biotin zu dem niedermolekularen Avidin weist dieses Verfahren eine sehr hohe Sensitivität auf.

Um Cb-D9k zu markieren, wurde ein polyklonaler Primärantikörper (Rabbit antibody, to Calbindin D-9k, Swant, Bellinzona, CH) verwendet. Beim Sekundärantikörper handelt es sich um das biotinylierte Protein A (Biotinylated protein A, Amersham Int. Plc, Buckinghamshire, UK).

Mittels der Inkubation einer 3% Wasserstopperoxidlösung wurden Reaktionen spezifischer Proteine, wie der endogenen Peroxidase, verhindert. Die Verwendung des Protein-Block-Serum-Free (X0909, DakoCytomation, Zug, CH) wirkte einer allfälligen Hintergrundfärbung entgegen und sorgte für ein optimaleres Resultat.

Zur Visualisierung des Antigen/Antikörperkomplexes wurde das StreptABC-Complex/HRP Duet (Dako, Glostrup, DK) verwendet und anschliessend mit dem Chromogen DAB (Liquid DAB<sup>+</sup>Substrate, Dako, Baar, CH) sichtbar gemacht. Als Positivkontrolle wurde eine bereits geprüfte Probe vom Duodenum einer Ziege mitgeführt. Für die Negativkontrolle wurde an Stelle des Primärantikörpers mit TBS inkubiert. Der Tabelle 4 ist das vollständige Protokoll der immunhistochemischen Färbung für Cb-D9k zu entnehmen.

**Tabelle 4:** Immunhistochemie-Protokoll für Calbindin D9k.

Arbeitsgang	Medium	Dauer
1. Waschen in	Xylol	2 x 5 min
	Ethanol 100%	2 x 2 min
	Ethanol 96%	2 min
	Ethanol 70%	2 min
	Aqua dest.	5 min
2. Spülen mit	TBS	5 min
3. Waschen in	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	15 min
4. Spülen mit	TBS	5 min
	auf Coverplates bringen	
5. Spülen mit	TBS	5 min
6. Präinkubation mit	150 µl Protein- Block- Serum- Free	10 min
7. Inkubieren mit	150 µl Calbindin D-9k-AK,	60 min
Primärantikörper	Verdünnung 1:500 mit TBS	
8. Inkubieren mit	150 µl Protein A-Biotin	90 min
Sekundärantikörper	Verdünnung 1:1000 mit TBS	
9. Spülen mit	TBS	3 x 5 min
10. Inkubieren mit	StreptABComplex/HRP	30 min
11. Spülen mit	TBS	3 x 5 min
12. Entwickeln mit	DAB ohne Gegenfärbung	3 min
13. Spülen mit	TBS	5 min
14. Waschen in	Ethanol 96%	2 min
	Ethanol 100%	2 x 2 min
	Xylol	5 min
15. Eindecken mit	Pertex®	

TBS = Tris gepufferte NaCl-Lösung; pH = 7,6; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = Wasserstoffperoxid;

DAB = Chromogen 3,3' Diaminobenzidin

## 5.5 Auswertung

Alle immunhistochemisch angefärbten Schnitte wurden zunächst unter dem Mikroskop (Leica, DMLB®, Leica Microsystems AG, Glattbrugg, CH) histomorphologisch begutachtet. Dabei wurde vor allem auf eine homogene Farbreaktion, sowie auf die Erhaltung des Gewebes geachtet. Bei diesem ersten Überblick wurde festgestellt, dass nur im Oberflächenepithel der Darmmukosa eine positive Immunreaktion stattgefunden hat. Für die weitere Auswertung wurde das Oberflächenepithel des Duodenums nach seiner Lokalisation aufgeschlüsselt in Zottenbasis (DD ZB), Zottenmitte (DD ZM) und Zottenspitze (DD ZS). Das Oberflächenepithel des Caecums wurde unterteilt in das der Kryptenmündung (Cae KrM) und das eigentliche Oberflächenepithel selbst (Cae ObEp). Bei allen sechs Tieren einer Fütterungsgruppe (L, G, LG, GG) wurden zufällig je vier Ausschnitte von DD ZB, DD ZM und DD ZS ausgewählt. Ebenso wurde beim Caecum mit Cae KrM und Cae ObEp vorgegangen. Die ausgesuchten Abschnitte des Epithels wurden anschliessend mittels computerisierter Digitalkamera (Colorview 12, Leica Microsystems AG, Glattbrugg, CH) bei einer 400fachen Vergrösserung erfasst. Durch die Markierung eines gewebefreien Bezirks in den gewählten Ausschnitten konnte der Weissabgleich durchgeführt werden. Dieser entspricht einer 100%-igen Transmission. Bei allen Arbeitsschritten wurde stets unter standardisierten Bedingungen gearbeitet. Mit Hilfe der Software AnalySIS Pro® (Version 5.0, Soft Imaging System GmbH) wurde die mittlere Farbtintensität des Gewebes ermittelt. Es wurde ein Mittelwert aus jeder der oben genannten Lokalisationen (DD ZB; DD ZM; DD ZS und Cae KrM; Cae ObEp), sowie vom gesamten Duodenum und Caecum berechnet. Das Programm AnalySIS Pro® arbeitet mit einer Farbskala, die von 0 bis 256 reicht. Wobei der Wert 0 schwarz entspricht und 255 weiss. Das bedeutet, je höher der gemessene Transmissionswert, desto schwächer die dazugehörige Immunreaktion. Anschliessend wurden die Transmissionswerte (T) mit der Formel  $E = \lg(1/T/256)^{-1}$  in Extinktionswerte (E) umgerechnet. Für die folgenden statistischen Berechnungen wurden diese Extinktionswerte, die sich proportional zur Farbstoffmenge verhalten, verwendet.

## 5.6 Statistik

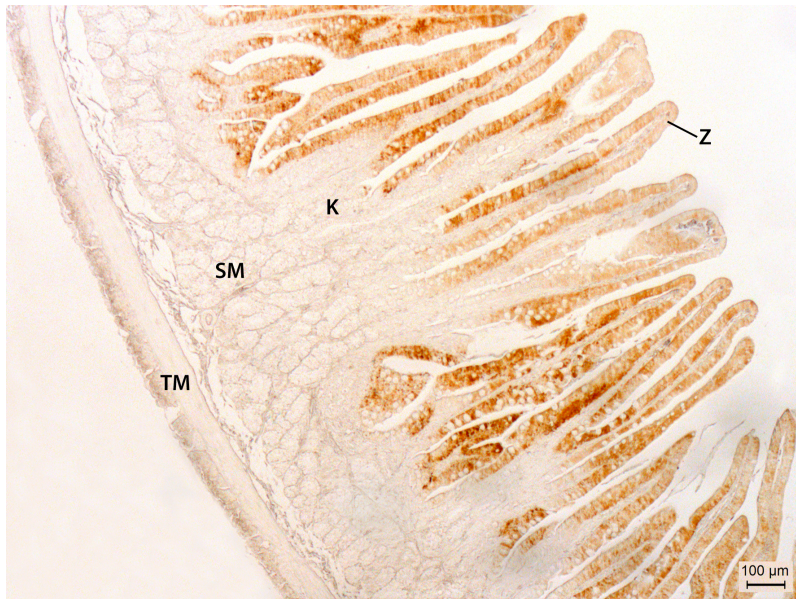
Für die statistische Analyse wurde mit den Mittelwerten (MW)  $\pm$  Standardfehler (StFe) der oben erwähnten Fütterungsgruppen (L, G, LG, GG) und Lokalisationen des Oberflächenepithels (DD ZB, DD ZM, DD ZS; Cae KrM, Cae ObEp) gearbeitet. Alle erhobenen Daten wurden mit dem Systat-Programm (Systat 11, Systat Software Inc., Point Richmond CA, USA) statistisch ausgewertet. Vergleiche der einzelnen Gruppen und Darmabschnitte wurden mittels einer wiederholten mehrdimensionalen Varianzanalyse erfasst (MANOVA). Zur Prüfung der einzelnen Gruppen- und Lokalisationsunterschiede wurden danach zwei ungepaarte Rangsummenteste durchgeführt (Kruskal-Wallis-Test, bzw. Mann-Whitney-U-Test). Für die Erfassung von Signifikanzen zwischen den Darmabschnitten sowie den Lokalisationen des Oberflächenepithels wurde für die Gruppen ein gepaarter Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentest angewendet. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p \leq 0.05$  festgelegt.

## 6 Resultate

### 6.1 Immunhistochemischer Nachweis von Calbindin D9k

#### 6.1.1 Darmabschnitte

Cb-D9k konnte immunhistochemisch in den Enterozyten des Oberflächenepithels von Duodenum und Caecum aller vier Fütterungsgruppen nachgewiesen werden. Die Becherzellen waren dabei stets frei von Cb-D9k. Auch das Stroma der Dünndarmzotten sowie die Krypten des Dünndarms zeigten keinen positiven Cb-D9k-Nachweis. Das Epithel der Kryptenmündungen wies dagegen im Caecum eine positive Anfärbung auf. Das Bindegewebe der Lamina propria, die Submucosa inklusive Brunnersche Drüsen des Duodenums sowie Tunica muscularis und Adventitia bzw. Tunica serosa waren stets frei von Cb-D9k-Immunreaktionen (Abb. 13 – 16).

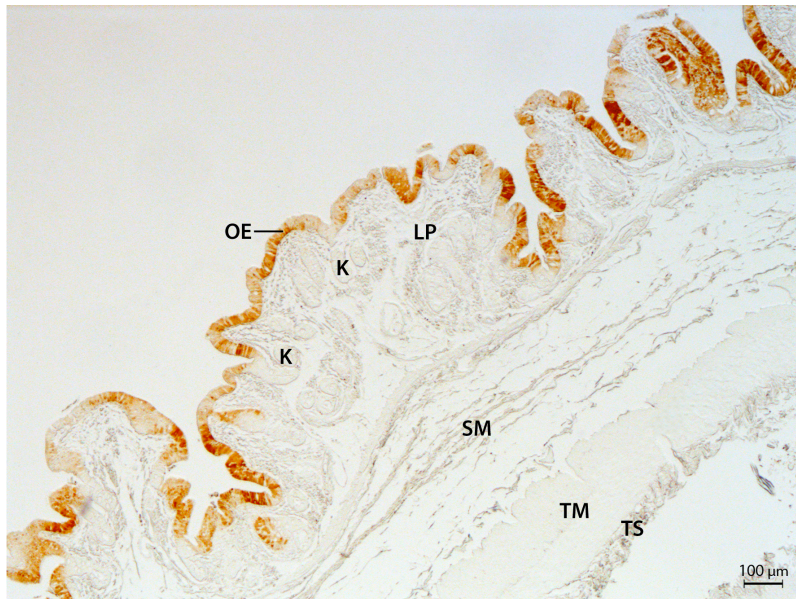


**Abb. 13:** Immunhistochemischer Nachweis von Calbindin-D9k im Duodenum (Gruppe Luzernemehl). Der Nachweis ist im Oberflächenepithel der Zotten (Z) positiv. Die Becherzellen zeichnen sich darin als negative helle Punkte ab (s.a. Abb. 14). Krypten und Brunnersche Drüsen in der Submucosa (SM) sind negativ. K: immunonegative Krypten; TM: Tunica muscularis



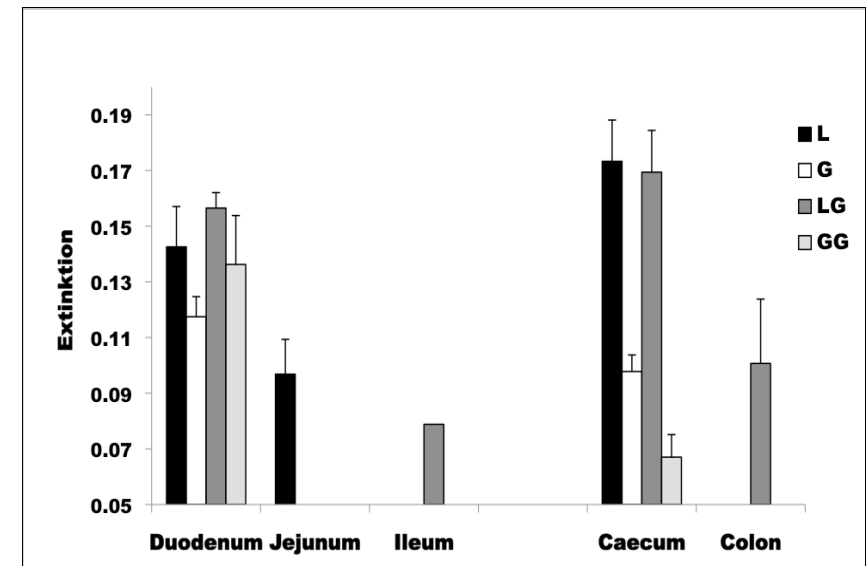
**Abb. 14:** Immunhistochemischer Nachweis von Calbindin-D9k im Duodenum (Gruppe Luzernemehl). ZM: Zottenmitte; ZS: Zottenspitze; B: immunonegative Becherzellen





**Abb. 15:** Immunhistochemischer Nachweis von Calbindin-D9k im Caecum eines Tieres aus der Gruppe Luzernemehl.  
OE: Oberflächenepithel; LP: Lamina propria; K: Krypten;  
SM: Submucosa; TM: Tunica muscularis; TS: Tunica serosa

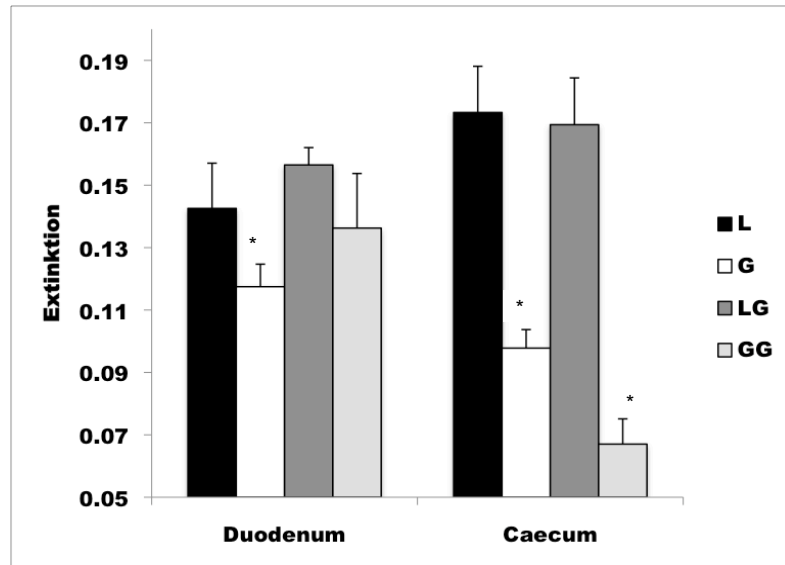
Bei allen 24 Tieren waren Duodenum und Caecum stets Cb-D9k-immunopositiv. Die mikrodensitometrisch erfasste immunhistochemische Cb-D9k-Reaktion war im Duodenum geringfügig ausgeprägter als im Caecum. Auffallend ist die starke Anfärbung des Cb-D9k in den mit Luzernemehl zugefütterten Gruppen L und LG (s. Anhang Tab.3). In der Gruppe L wurde zudem bei 2 Tieren eine schwache Anfärbung im Jejunum nachgewiesen. Ebenfalls schwache Immunreaktionen konnten in der Gruppe LG bei einem Tier im Ileum und bei 4 Tieren im Colon ausgemacht werden (Abb.16).



**Abb.16:** Graphische Darstellung des mittleren Calbindin-D9k-Extinktionswertes +/- Standardfehler der einzelnen Darmabschnitte in Abhängigkeit von der Fütterung.

Fütterungsgruppen: L = Luzernemehl; G = Grasmehl; LG = Luzerne- und Getreidemehl; GG = Gras- und Getreidemehl

Innerhalb der einzelnen Fütterungsgruppen bestand ein signifikanter Unterschied zwischen Duodenum und Caecum ( $p < 0.0001$ ). (Abb. 17).



**Abb.17:** Graphische Darstellung der mittleren Calbindin-D9k-Extinktionswerte +/- Standardfehler von den Darmabschnitten Duodenum und Caecum in Abhängigkeit von der Fütterung. Die statistisch signifikanten Differenzen sind der Tab. 1 zu entnehmen.

\* = signifikante Gruppenunterschiede

Fütterungsgruppen: L = Luzernemehl; G = Grasmehl; LG = Luzerne- und Getreidemehl; GG = Gras- und Getreidemehl

Tabelle 1 zeigt die signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Darmabschnitten und den verschiedenen Gruppen. Zudem ist zu erwähnen, dass in der Gruppe LG zwischen dem Duodenum und dem Colon die Signifikanzschwelle nur knapp verpasst wurde ( $p = 0.068$ ).

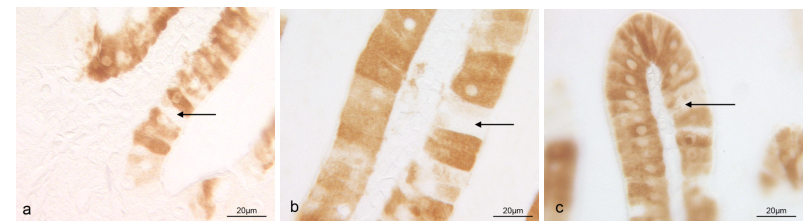
**Tabelle 1:** Statistische Signifikanzen der Cb-D9k-Immunoreaktivität zwischen den Darmabschnitten Duodenum und Caecum in Abhängigkeit von der Fütterung.

Gruppe	p-Wert
L	0.028
G	0.046
LG	n.s
GG	0.043

## 6.1.2 Epithellokalisationen

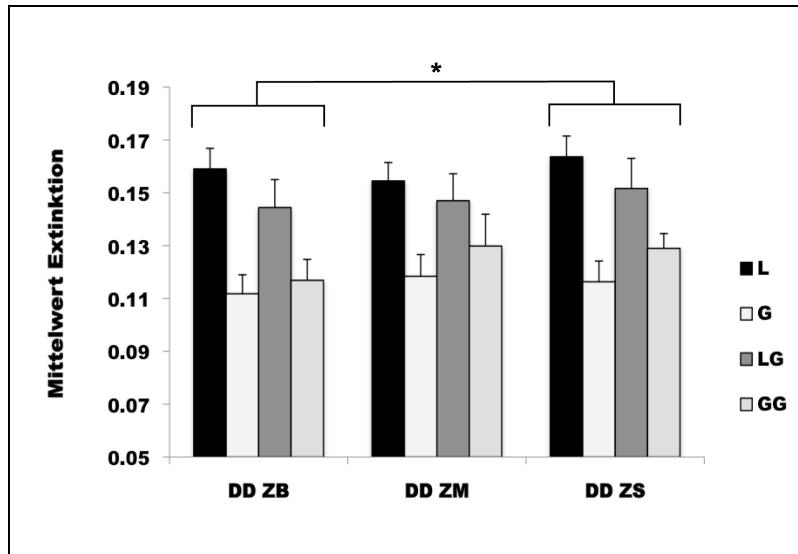
### 6.1.2.1 Duodenum

Das Oberflächenepithel des Duodenums wurde bei der Erfassung der Messwerte weiter unterteilt in die Lokalisationen Zottenbasis (DD ZB), Zottenmitte (DD ZM) und Zottenspitze (DD ZS). In allen Abschnitten konnte eine Immunreaktion nachgewiesen werden (s. Beispiele Abb. 18a-c). Alle Extinktionswerte der einzelnen Tiere und Fütterungsgruppen sind im Anhang der Tabelle 4a zu entnehmen.



**Abb. 18:** Immunhistochemischer Nachweis von Calbindin-D9k an den Lokalisationen Zottenbasis (a), Zottenmitte (b) und Zottenspitze (c) des Duodenums. Beachte die stärkere Immunreaktion an der Zottenspitze im Vergleich zur Zottenbasis. Becherzellen (—) zeigen keine Immunreaktion.

Im Duodenum wurden sowohl signifikante Gruppenunterschiede ( $p = 0.005$ ) wie auch signifikante Lokalisationsunterschiede am Oberflächenepithel festgestellt ( $p = 0.024$ ). Zwischen den Lokalisationen DD ZS und DD ZB bestand ein signifikanter Unterschied von  $p = 0.006$ . Die Lokalisation DD ZS wies im Mittelwert eine signifikant stärkere Reaktion auf als die Lokalisation DD ZB. DD ZS zu DD ZM und DD ZB zu DD ZM wiesen keine statistischen Signifikanzen auf (s. Abb. 19):



**Abb. 19:** Graphische Darstellung des mittleren Calbindin-D9k-Extinktionswertes +/- Standardfehler des Duodenum in Abhängigkeit von der Epithellokalisation und der Fütterung. Die statistisch signifikanten Differenzen sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

\*  $p < 0.01$  in Bezug auf die Gewebelokalisation

Fütterungsgruppen: L = Luzernemehl; G = Grasmehl; LG = Luzerne- und Getreidemehl; GG = Gras- und Getreidemehl

Epithellokalisationen: DD ZB = Duodenum Zottenbasis; DD ZM = Duodenum Zottenmitte; DD ZS = Duodenum Zottenspitze

Der Tabelle 2 sind die Gruppenunterschiede der einzelnen Epithellokalisationen des Duodenum in Abhängigkeit von der Fütterung zu entnehmen.

**Tabelle 2:** Einfluss der Fütterung auf die Calbindin-D9k-Immunoreaktivität in Abhängigkeit von der Epithellokalisation: P-Werte des Mittelwertvergleichs.

Gruppe	DD-ZB p-Wert	DD-ZM p-Wert	DD-ZS p-Wert
L⇔G	<b>0.004 ↑</b>	<b>0.010 ↑</b>	<b>0.004 ↑</b>
L⇔LG	0.337	0.522	0.873
L⇔GG	<b>0.028 ↑</b>	0.144	<b>0.011 ↑</b>
G⇔LG	<b>0.055 ↓</b>	<b>0.078 ↓</b>	0.109
G⇔GG	0.715	0.465	0.273
LG⇔GG	<b>0.068 ↑</b>	0.273	0.201

**Fett** = signifikant, **fettkursiv** = Signifikanzschwelle knapp verpasst

Fütterungsgruppen: L = Luzernemehl; G = Grasmehl; LG = Luzerne- und Getreidemehl; GG = Gras- und Getreidemehl

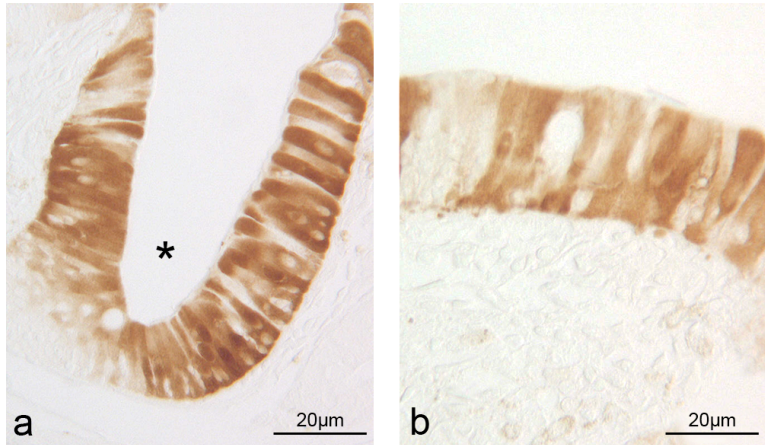
Epithellokalisationen: DD ZB = Duodenum Zottenbasis; DD ZM = Duodenum Zottenmitte; DD ZS = Duodenum Zottenspitze

↑/↓ bedeutet signifikant höher / tiefer



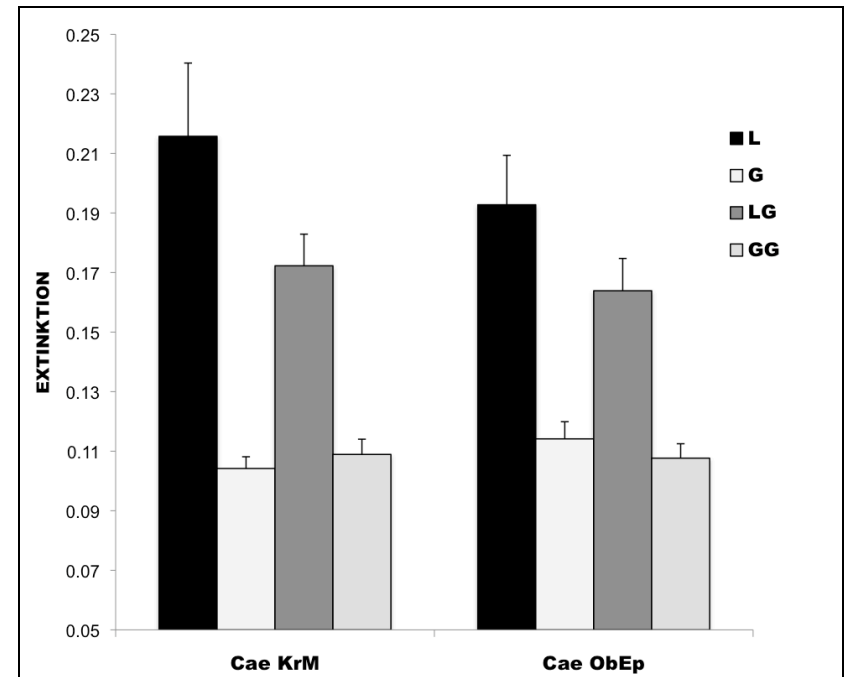
### 6.1.2.2 Caecum

Im Caecum wurde das Oberflächenepithel weiter unterteilt in die Lokalisationen Kryptenmündung (Cae KrM) und das eigentliche Oberflächenepithel (Cae ObEp) selbst (Abb.20a und 20b).



**Abb. 20:** Immunhistochemischer Nachweis von Calbindin-D9k an der (a) Kryptenmündung (\*) und an der freien Oberfläche (b) des Caecums.

Bei dem Vergleich der Epithellokalisierungen im Caecum nimmt die immunhistochemische Reaktion von der Kryptenmündung (Cae KrM) hin zur freien Oberfläche (Cae ObEp) tendenziell ab. Einzig in der Gruppe G wurde in der Kryptenmündung des Caecums eine geringfügig schwächere Reaktion gemessen als im Oberflächenepithel. Alle Extinktionswerte der Epithellokalisierungen des Caecums der einzelnen Tiere und Fütterungsgruppen sind im Anhang der Tabelle 4a zu entnehmen. Im Caecum zeigte die statistische Überprüfung über die vier Gruppen signifikante Gruppenunterschiede ( $p < 0.0001$ ) (s. Tab. 3). Der Vergleich der Epithellokalisierungen hingegen wies über die vier Gruppen keine statistische Signifikanz auf ( $p = 0.125$ ) (s. Abb. 21).



**Abb. 21:** Graphische Darstellung des mittleren Calbindin-D9k-Extinktionswertes +/- Standardfehler des Caecums in Abhängigkeit von der Epithellokalisation und der Fütterung. Die statistisch signifikanten Differenzen sind der Tab. 3 zu entnehmen.

Fütterungsgruppen: L = Luzernemehl; G = Grasmehl; LG = Luzerne- und Getreidemehl; GG = Gras- und Getreidemehl  
 Epithellokalisierungen: Cae KrM = Caecum Kryptenmündung; Cae ObEp = Caecum Oberflächenepithel

Beim Vergleich der beiden Epithellokalisierungen des Caecums wurden signifikante Unterschiede in Abhängigkeit von der Fütterungsgruppe festgestellt. Keine signifikanten Unterschiede wiesen lediglich die Fütterungsgruppen mit demselben Futterbestandteil auf (Tab.3).

**Tabelle 3:** Vergleich der Extinktionswerte der verschiedenen Epithelabschnitte des Caecums in Abhängigkeit von der Fütterungsgruppe.

Gruppe	Cae KrM p-Wert	Cae ObEp p-Wert
L⇔G	<b>0.006 ↑</b>	<b>0.006 ↑</b>
L⇔LG	0.109	0.150
L⇔GG	<b>0.018 ↑</b>	<b>0.011 ↑</b>
G⇔LG	<b>0.004 ↓</b>	<b>0.006 ↓</b>
G⇔GG	n.s.	n.s.
LG⇔GG	<b>0.006 ↑</b>	<b>0.006 ↑</b>

**Fett** = signifikant

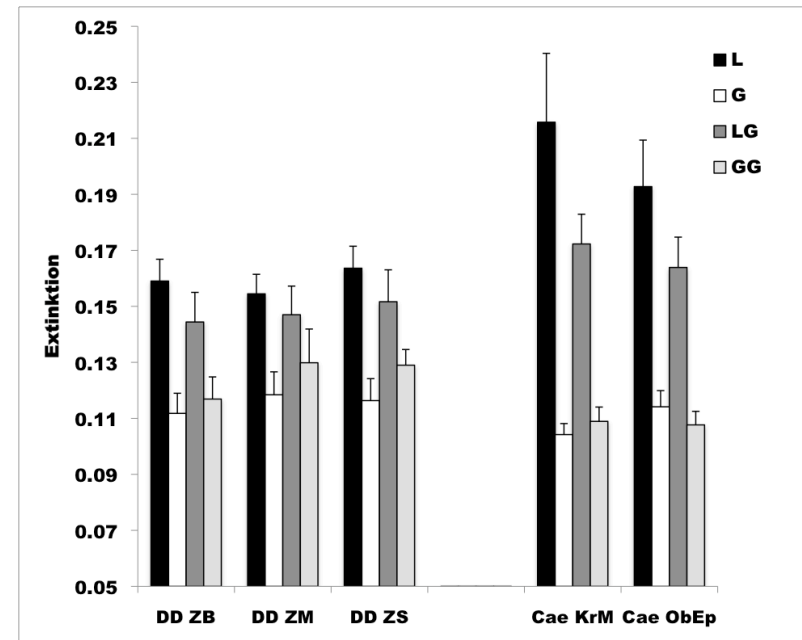
Fütterungsgruppen: L = Luzernemehl; G = Grasmehl; LG = Luzerne- und Getreidemehl;  
GG = Gras- und Getreidemehl

Epithellokalisierungen: Cae KrM = Caecum Kryptenmündung; Cae ObEp = Caecum Oberflächenepithel

↑/↓ bedeutet signifikant höher / tiefer

### 6.1.2.3 Gegenüberstellung der Immunreaktivität von Duodenum und Caecum

Bei diesem Vergleich fällt auf, dass die Immunreaktionen der Gruppen L und LG im Caecum stärker ausgeprägt sind als im Duodenum. In den Fütterungsgruppen G und GG wiederum fand eine leicht stärkere Immunreaktion im Duodenum statt. Vergleicht man die Durchschnittswerte der Epithellokalisierungen beider Darmabschnitte, so nimmt die immunhistochemische Reaktion im Caecum von der Kryptenmündung (Cae KrM) hin zur freien Oberfläche (Cae ObEp) tendenziell leicht ab. Im Duodenum weist die Zottenspitze (DD ZS) die stärkste Cb-D9k-Immunreaktion auf, gefolgt von der Zottenmitte (DD ZM) und der Zottenbasis (DD ZB). Dies veranschaulicht Abb. 22.



**Abb.22:** Graphische Gegenüberstellung des mittleren Calbindin-D9k Extinktionswertes +/- Standardfehler von Duodenum und Caecum in Abhängigkeit von der Epithellokalisierung und der Fütterung.

Fütterungsgruppen: L = Luzernemehl; G = Grasmehl; LG = Luzerne- und Getreidemehl; GG = Gras- und Getreidemehl

Epithellokalisierungen: DD ZB = Duodenum Zottenbasis; DD ZM = Duodenum Zottenmitte; DD ZS = Duodenum Zottenspitze; Cae KrM = Caecum Kryptenmündung; Cae ObEp = Caecum Oberflächenepithel

## 7 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Vorkommen und die Lokalisation des Calciumbindenden Proteins Cb-D9k in den verschiedenen Darmabschnitten des Kaninchens immunhistochemisch nachzuweisen. Durch die Bildung von vier Fütterungsgruppen (L, G, LG, GG) wurde überprüft, wie sich unterschiedliche Ca- und P- Gehalte in der Ration auf die Ca-Absorption im Kaninchendarm mit Cb-D9k als Parameter auswirken. Obwohl die genauen Funktionen von Calbindin innerhalb des Ca-Haushaltes noch nicht vollständig erforscht sind, weiss man, dass Cb-D9k im Darm von Säugetieren u.a. für den Ca-Transport durch das Cytosol verantwortlich ist (Christakos et al., 2003). Studien haben gezeigt, dass bei der aktiven Ca-Absorption im Darm die Syntheserate von Cb-D9k durch die Bindung der 6-s-trans-Calcitriol-Form an den VDR<sub>nuc</sub> gesteigert wird (Norman, 2006).

### 7.1 Diskussion der Resultate

#### 7.1.1 Nachweis von Calbindin D9k

Aktive Transportmechanismen konnten beim Kaninchen bislang nur im Dünndarm (Kamphues et al., 1985) und im distalen Colon nachgewiesen werden (Wiener et al., 1990). In der vorliegenden Studie konnte mittels Immunhistochemie Cb-D9k bei allen Tieren im Oberflächenepithel des Duodenums und des Caecums nachgewiesen werden. Auffallend dabei ist, dass der Nachweis bei Tieren, welche einen hohen Anteil Luzernemehl in der Ration hatten (Gruppen L und LG), besonders ausgeprägt war (s. 7.3.2). Der immunhistochemische Nachweis im Caecum untermauert die Annahme, dass beim Kaninchen dieser Darmabschnitt für die aktive transzelluläre Ca-Absorption von grosser Bedeutung ist. Beim Dickdarmverdauung Pferd hingegen scheint der Dickdarm eine eher untergeordnete Rolle in Bezug auf die aktive Ca-Absorption zu spielen. Beim Pferd soll die aktive Ca-Absorption hauptsächlich im Dünndarm stattfinden (Müller, 2010; Sprekeler, 2011). Obwohl in der Studie von Cechak et al. (2009) im Caecum und im dorsalen Colon Ca-Nettofluxe beobachtet wurden, konnten die grössten Ca-Nettofluxe im Duodenum des Pferdes nachgewiesen werden, gefolgt vom Jejunum. Auch Studien an der Ratte als Monogastrier zeigen gegensätzliche Resultate auf. In der Studie von Karbach und Feldmeier (1993) wird gar das Caecum als Darmabschnitt mit der höchsten Ca-Absorption erwähnt, während in einer anderen Studie die stärkste Ca-Absorption im Duodenum und im Colon der Ratte nachgewiesen wurde (Favus und Pak, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden im Duodenum signifikante Lokalisationsunterschiede innerhalb des Oberflächenepithels festgestellt. Die im Vergleich zur Zottenbasis stärkere Immunreaktion an der Zottenspitze des Duodenums wurde auch an früheren Studien bei der Ratte beobachtet (Taylor et al., 1984; Smith et al., 1985). Bei einer ähnlichen Studie beim Pferd, konnte Cb-D9k ebenfalls vorwiegend in den Enterozyten des Oberflächenepithels nachgewiesen werden (Müller, 2010). Somit decken sich die erzielten Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung weitgehend mit der Hypothese, dass die grösste Kapazität für einen aktiven, transzellulären Ca-Transport in ausgereiften Enterozyten vorliegt (Walters und Weiser, 1987). Je differenzierter die Darmepithelzelle, desto eher ist sie höheren Stoffwechselaufgaben, wie beispielsweise der Genexpression bestimmter Proteine gewachsen. Dem entsprechend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie eine erhöhte Expression von Cb-D9k in den ausgereiften Enterozyten an der Zottenspitze des Duodenums. Betreffend der Lokalisation des VDRs im Gewebe nimmt die Arbeit von Walters und Weiser (1987) ebenfalls Bezug auf die Enterozytendifferenzierung. Der grösste VDR-Anteil liegt im Drüsenepithel und in den basalen Abschnitten des Oberflächenepithels. Diese Abschnitte können demnach rasch auf Änderungen von Calcitriol reagieren, indem die aktive Ca-Absorption induziert wird. Beim Kaninchen wurde in der Arbeit von de Vries de Heekelingen (2008) in allen Darmabschnitten eine gegenüber dem Oberflächenepithel signifikant stärkere VDR-Immunreaktion im Drüsenepithel nachgewiesen. Ähnliche VDR-Verteilungsmuster im Darm wurden bei der Kuh, der Ziege und beim Schaf (Liesegang et al., 2008), sowie kürzlich beim Pferd (Müller, 2010) nachgewiesen. Die immunhistochemisch dokumentierte Verteilung des VDR wurde bei vielen Tierarten erforscht. Bei den meisten Studien nahm dabei die Menge des VDR im Darmkanal vom proximalen Dünndarm hin zum Dickdarm ab. Es handelt sich dabei um Studien an Kühen, Ziegen, Schafen sowie dem Dickdarmverdauung Pferd (Riner, 2006; Boos et al., 2007; Riner et al., 2008; Singer, 2008; Müller, 2010). Bereits in früheren Studien wird beschrieben, dass bei einer adäquaten Ca-Versorgung die grösste Ca-Menge im Dünndarm aufgenommen wird (Bronner und Pansu, 1999). Einen bedeutenden Einfluss auf die intestinale Ca-Absorption scheint dabei die Verweilzeit der Ingesta zu haben. Bei Ratten und Hunden wird die Hauptmenge des den Dünndarm passierenden Ca, aufgrund der längeren Passagezeit, im Ileum absorbiert. (Marcus, 1962; Cramer 1965). Im Dickdarm hingegen wird bei den meisten Säugern kaum Ca absorbiert (Eckermann-Ross, 2008). Diese Annahme unterstützen auch Studien über die Messung von Ca-Fluxen mit Hilfe der Methodik der

Ussing-Kammer. So wurde beim Pferd die grösste Menge positiver Fluxe im Duodenum gemessen (Liesegang et al., 2009). Beim Kaninchen allerdings wurden im Duodenum und im Caecum die grössten Mengen positiver Ca-Fluxe gemessen (Liesegang et al., 2008).

Spezies, physiologischer Zustand des Tieres und somit auch die Fütterung scheinen bei der Lokalisation und der Menge der Ca-Aufnahme eine wichtige Rolle zu spielen. Grundsätzlich ist die intestinale Ca-Absorption bei höherem Bedarf (Trächtigkeit, Laktation, Wachstum) oder bei einem knappen Ca-Angebot effizienter. Beim Wiederkäuer konnten Lauff et al. (2010) beispielsweise anhand von Untersuchungen bei Schafen und Ziegenlämmern eine aktive Ca-Absorption im Pansen nachweisen. Diese war bei den Ziegen durch die zusätzliche Verabreichung von Calcitriol stimulierbar (Breves et al. 1989). Bei den Schafen hingegen konnte durch das gleiche Verfahren keine Aktivierung der Ca-Absorption im Pansen nachgewiesen werden (Schröder, 1999). Eine neuere Studie beim Schaf konnte zeigen, dass die intestinale Ca-Absorption beim Schaf vorwiegend im Jejunum stattfindet (Wilkens et al., 2009).

Die Syntheserate von Cb-D9k wird durch die Bindung von Calcitriol an den VDR gesteigert. Demzufolge sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob Cb-D9k in denselben Darmabschnitten nachweisbar ist wie der VDR. Die Untersuchung von De Vries de Heekelingen (2008) am Kaninchen ergab folgendes VDR-Verteilungsmuster: Caecum > Duodenum > Jejunum > Colon > Ileum. Die stärksten Cb-D9k-Immunreaktionen in der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls in Duodenum und Caecum nachgewiesen. Dies bestätigt die Theorie, dass beim Kaninchen als caecotropher Tierart nebst dem Duodenum das Caecum eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der aktiven Ca-Absorption einnimmt. Wie bereits erwähnt scheint im Gegensatz dazu beim Dickdarmverdauungspferd das Duodenum der Hauptort der aktiven Ca-Absorption zu sein. In der Studie von Müller (2010) wurde in diesem Darmabschnitt die stärkste Expression sowohl von Cb-D9k als auch von VDR nachgewiesen. Zum gleichen Ergebnis kamen auch Sprekeler et al. (2010), welche zusätzlich das Transportelement TRPV6 beim Pferd untersuchten. Weiter konnte in den Darmabschnitten Caecum, Ileum und dem ventralen Colon des Pferdes eine abnehmende Cb-D9k Expression ermittelt werden (Müller, 2010). Studien an Kühen, Ziegen und der Maus ergaben ebenfalls eine von proximal nach distal abnehmende Cb-D9k-Expression (Yamagishi et al., 2002; van Abel et al., 2003; Yamagishi et al., 2006). Bei der Ziege wurde zudem im Vormagen eine Cb-D9k-Reaktion nachgewiesen (Sidler-Lauff et al., 2009).

Obwohl zahlreiche Studien das Vorkommen und die nötige Funktion der Transportelemente der transzellulären Ca-Resorption belegen, wird deren Notwendigkeit in der Literatur kontrovers diskutiert. So beschreiben beispielsweise Benn et al. (2008) in ihrer Studie anhand von Cb-D9k- und TRPV6-Knock-out-Mäusen, dass die aktive intestinale Calcium-Absorption auch ohne die Anwesenheit der besagten Proteine funktioniert. Ähnlich erwähnen Akther et al. (2008) die Unabhängigkeit von Cb-D9k bei der Calcitriol-induzierten Ca-Aufnahme im Darm. Die Studie von Lee et al. (2007) unterstützt die Annahme, dass die aktive Ca-Aufnahme im Darm in Abwesenheit von Cb-D9k durch andere Proteine kompensiert werden kann. Andererseits weisen verschiedene Autoren auf die gegenseitige Abhängigkeit einiger Proteine hin. Hoenderop et al. (2000) gelang im Duodenum vom Kaninchen der Nachweis einer kompletten Colokalisation zwischen dem epithelialen Ca-Kanal ECAC (TRPV5), Cb-D9k und PMCA. Auch Wilkens (2006) gelang der Nachweis einer Colokalisation von Calbindin-D9k mit TRPV5/6 in Duodenum und Jejunum vom Schaf. In der Arbeit von Peng et al. (2003) werden anhand von Studien an Mäusen koordinierte Mechanismen zwischen den Proteinen ECAC2 (TRPV6) und Cb-D9k beschrieben. Beide Proteine sind für eine erhöhte Ca-Aufnahme zuständig. Bei einem allfälligen Überangebot an Calcium wirken sie mit Hilfe eines gemeinsamen Feedback-Mechanismus toxischen intrazellulären Ca-Konzentrationen entgegen (Weber et al., 2001; Peng et al., 2003). Das Zusammenspiel von Cb-D9k und anderen Transportproteinen untermauert weiter die Annahme, dass apikal vorkommende Ca-Kanäle und das intrazelluläre Cb-D9k im Darm für eine kontrollierte, aktive Ca-Aufnahme sowie die cytosolische Ca-Durchschleusung verantwortlich sind.

### 7.1.2 Einfluss der Rationsgestaltung

Der physiologische Zustand und die Zusammensetzung der Rationsgestaltung spielen bei der gastrointestinalen Ca-Absorption eine wichtige Rolle. Bei laktierenden Milchkühen und Ziegenlämmern konnte beispielsweise eine erhöhte präduodenale Ca-Absorption nachgewiesen werden (Breves und Schröder, 2005; Ricken, 2005; Liesegang et al., 2007; Lauff, 2009). Liesegang et al. (2007) stellten anhand von Colonbiopsien bei trächtigen und laktierenden Schafen und Ziegen einen VDR-Anstieg fest. Diese Resultate bestätigen die Annahme, dass Tiere unter besonderen physiologischen Bedingungen die aktive intestinale Ca-Aufnahme stimulieren können. Durch das ständige Wachstum der Zähne besitzt das Kaninchen im

Vergleich zu anderen Spezies einen lebenslangen erhöhten Bedarf an Calcium. Demzufolge ist das Kaninchen auf eine effektive Ca-Absorption im Darm angewiesen. Wie bereits erwähnt, hängt beim Kaninchen der variierende Ca-Gehalt im Blutplasma direkt von der Versorgung über das Futter ab. Bei einem Überangebot wird das überschüssige Calcium mit dem Urin ausgeschieden (Eckermann-Ross, 2008). In einer Studie mit Vitamin-D-defizienten Kaninchen wird beschrieben, dass die Tiere netto keine Änderung in der intestinalen Ca-Absorption aufwiesen. Es wurde jedoch weniger Ca und P über den Urin ausgeschieden (Redrobe, 2002). Umgekehrt wird auch bei einer Ca-Übersorgung die Absorption im Darm nicht reduziert, sondern resultiert in einer gesteigerten Calciurie. All dies spricht für einen äusserst effizienten Ca-Absorptionsmechanismus im Darmtrakt des Kaninchens (Eckermann-Ross, 2008). Ein ausgewogener Ca-Anteil in der Ration ist bei dieser Tierart von grosser Bedeutung.

Die statistische Überprüfung über die vier Fütterungsgruppen in der vorliegenden Studie ergab sowohl für das Duodenum als auch für das Caecum signifikante Gruppenunterschiede. Im Duodenum wurde die stärkste Immunreaktion über die vier Fütterungsgruppen in der Gruppe LG beobachtet, während im Caecum die Hauptreaktion in der Gruppe L auszumachen war. Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Futtermittel fanden auch in der Studie von Liesegang et al. (2008), de Vries de Heekelingen (2008) und Burger (2009) Anwendung. Bei der Messung von Ca-Fluxraten im Duodenum und Caecum beim Kaninchen zeigten sich interessanterweise deckungsgleiche Ergebnisse (Liesegang et al., 2008). Auch in der Arbeit von de Vries de Heekelingen (2008) wurden in allen Darmabschnitten der Gruppen L und LG eine gegenüber den Gruppen G und GG höhere Menge an VDR immunhistochemisch nachgewiesen. Im Gegensatz zu anderen Spezies sprechen diese Ergebnisse dafür, dass der aktive Transport von Ca im Darm vom Kaninchen nicht nur bei knappen Ca-Verhältnissen zum Tragen kommt. In der Arbeit von Burger (2009) konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Ca-Gehalt im Futter zu einer vermehrten Ca-Retention führt. Einen wichtigen Einfluss auf die intestinale Ca-Absorption beim Kaninchen wird dem Ca:P-Verhältnis zugesprochen, da ein Anstieg des Ca-Gehalts im Futter die scheinbare Verdaulichkeit von P reduziert. Ursache dafür dürfte die Komplexbildung schwer löslicher Ca-P-Verbindungen im Darmkanal sein (Kamphues et al., 1985). Die im Dünndarm gebildeten, unlöslichen Ca-P-Komplexe würden der mikrobiellen Flora im Dickdarm den essentiellen P entziehen. Durch eine exzessive Ca-Absorption im proximalen Dünndarm und im Caecum steht für diese Komplexbildung

weniger Ca zur Verfügung. Dieser Mechanismus gewährleistet dem Kaninchen genügend hohe P-Levels für die mikrobielle Fermentation im Caecum (Liesegang et al., 2008). P ist der Hauptbestandteil der bakteriellen Trockenmasse und somit auch für die Produktion der flüchtigen Fettsäuren bedeutend. Diese stellen für das Kaninchen eine wichtige Energiequelle dar. Die erzielten hohen Cb-D9k-Werte im Duodenum und im Caecum der Gruppen L und LG, welche beide ein hohes Ca:P-Verhältnis vorweisen, lassen sich damit wohl erklären.

Ferner wirkt sich ein hoher Fettanteil in der Ration geringfügig negativ auf die Ca-Absorbierbarkeit im Darmtrakt aus (Cheeke und Amberg, 1973). Je höher der Fettanteil, desto vermehrt werden Chelate gebildet (Eckermann-Ross, 2008). In der vorliegenden Studie bestätigt sich dieser Sachverhalt. Die Fütterungsgruppen L (Rfe: 1.9 %) und LG (Rfe: 3.5 %), welche einen tieferen Rohfettanteil besitzen als die Gruppen G (Rfe: 4.0 %) und GG (Rfe: 5.1 %), erreichten höhere Cb-D9k-Werte. In der Studie von Burger (2009) wurde die stärkste Ca-Aufnahme ebenfalls in der am wenigsten Rfe enthaltenden L-Gruppe nachgewiesen.

Wie bereits erwähnt, nimmt Cb-D9k in den Enterozyten nebst der Funktion als intrazelluläres Shuttleprotein für Ca auch die Rolle eines cytosolischen Puffers wahr. Die hohen Cb-D9k-Werte in Duodenum und Caecum der Gruppen L und LG liessen sich weiter damit erklären, dass die Kaninchen mit Hilfe von Cb-D9k versuchen, einem toxischen intrazellulären Ca-Gehalt entgegenzuwirken. Ein weiterer Punkt in Bezug auf die exzessive Ca-Absorption beim Kaninchen steht sicherlich im Zusammenhang mit der Caecotrophie. Die wiederholte Verdauung des Ca-haltigen Weichkots führt einerseits zu einer verlängerten Passagezeit und andererseits zu einer erneuten Ansäuerung der Ingesta. Beides erhöht die Absorptionsrate von Ca (Kamphues et al., 1985).

#### 7.4 Schlussfolgerungen

Die Resultate der vorliegenden Arbeit bestätigen grundsätzlich eine exzessive Ca-Absorption beim Kaninchen, da auch bei genügend hohen Ca-Gehalten in der Ration dieses aktiv resorbiert wurde. Im Gegensatz dazu wird bei den meisten Monogastriern und Wiederkäuern Ca nur nach Bedarf absorbiert (Cheeke und Amberg, 1973). Der immunhistochemische Nachweis von Cb-D9k der vorliegenden Studie in Duodenum und Caecum bestätigt, dass beim Kaninchen hauptsächlich in diesen beiden Darmabschnitten die aktive, transzelluläre Ca-Absorption stattfindet. Deswei-

teren weisen die erzielten Resultate darauf hin, welcher wichtigen Stellenwert P bei der mikrobiellen Fermentation im Dickdarm des Kaninchens einnimmt. Dadurch dass Ca den P komplexiert, dient eine exzessive Ca-Absorption dazu, dass genügend hohe P-Levels der Mikroflora des Dickdarms zur Verfügung stehen. Dieser Aspekt sollte bei der Zusammensetzung bzw. der Zusammensetzung der Futtermittel für Kaninchen unbedingt berücksichtigt werden.

## 8 Literaturverzeichnis

- Benn, B. S., D. Ajibade, A. Porta, P. Dhawan, M. Hediger, J. B. Peng, Y. Jiang, G. T. Oh, E. B. Jeung, L. Lieben, R. Bouillon, G. Carmeliet und S. Christakos (2008). Active intestinal calcium transport in the absence of transient receptor potential vanilloid type 6 and calbindin-d9k. *Endocrinology* 149(6): 3196-205.
- Bouillon, R., G. Eelen, L. Verlinden, C. Mathieu, G. Carmeliet und A. Verstuyf (2006). Vitamin D and cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102(1-5): 156-62.
- Breves, G., G. Gäbel, E. Pfeffer und H. Martens (1989). Unidirectional calcium fluxes across the isolated rumen mucosa of goats as affected by 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. *Proc. Nutr. Soc.* 48: 163A.
- Breves, G., M. Diener, H. Ehrlein, W. von Engelhardt, M. Kaske, S. Leonhard-Marek, H. Martens, P. Möller, E. Scharrer, M. Schemann und S. Wolfram (2000). Physiologie des Magen-Darm-Kanals. *Physiologie der Haustiere*. W. von Engelhardt und G. Breves. Stuttgart, Enke: 303-407.
- Breves, G. und B. Schröder (2005). Vergleichende Aspekte der gastrointestinalen Calcium-Umsetzung beim Schwein und Wiederkäuer. *Lohmann Information* 2: 1-3.
- Bronner, F. (2009). Recent developments in intestinal calcium absorption. *Nutr Rev* 67(2): 109-13.
- Bronner, F. und D. Pansu (1999). Nutritional aspects of calcium absorption. *J Nutr* 129(1): 9-12.
- Brown, E. M. und R. J. MacLeod (2001). Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev* 81(1): 239-297.
- Bucher, O. und H. Wartenberg (1989). *Mikroskopische Anatomie: IV Verdauungsapparat. Cytologie Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Bern, Verlag Hans Huber: 369-432.
- Cehak, A., F. Geburek, K. Feige, B. Schröder und G. Breves (2009). Functional characterisation of calcium and phosphate transport across equine intestine. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 137.
- Cheeke, P. (1994). *Biology of the Laboratory Rabbit*. San Diego.
- Cheeke, P. R. und J. W. Amberg (1973). Comparative calcium excretion by rats and rabbits. *J Anim Sci* 37(2): 450-4.
- Chemistry, D. o. (2009). "Tertiary Structure of Proteins - I." from <http://chemistry.umeche.maine.edu/MAT500/Proteins8.html>.
- Christakos, S., F. Barletta, M. Huening, P. Dhawan, Y. Liu, A. Porta und X. Peng (2003). Vitamin D target proteins: function and regulation. *J Cell Biochem* 88(2): 238-44.

Christakos, S., C. Gabrielides und W. B. Rhoten (1989). Vitamin D-dependent calcium binding proteins: chemistry, distribution, functional considerations, and molecular biology. *Endocr Rev* 10(1): 3-26.

Cramer, C. F. (1965). Sites of Calcium Absorption and the Calcium Concentration of Gut Contents in the Dog. *Can J Physiol Pharmacol* 43: 75-8.

de Vries de Heekelingen, T. (2008). immunhistochemische Untersuchung zur Verteilung von Vitamin D-Rezeptoren im Darm von Kaninchen. Zürich, Universität Zürich: 72.

Donnelly, T. (1997). Section Two: Rabbits; Basic Anatomy, Physiology, and Husbandry. Ferrets, Rabbits and Rodents: Clinical Medicine and Surgery. K. Quesenberry und E. Hillyer. St.Louis, Saunders: 145-160.

Dusso, A. S., A. J. Brown und E. Slatopolsky (2005). Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 289(1): F8-28.

Eckermann-Ross, C. (2008). Hormonal regulation and calcium metabolism in the rabbit. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 11(1): 139-52, vii.

Favus, M. J. und C. Pak (2001). Evidence for absorption of ionic calcium and soluble calcium complexes by the duodenum and cecum in the rat. *Am J Ther* 8(6): 425-31

Fekete, S. und W. Wiesenmüller (1993). Ernährung der Kaninchen. Ernährung monogastrischer Nutztiere. J. Leibetseder. Stuttgart, Gustav Fischer: 211-229.

Fullmer, C. S. und R. H. Wasserman (1981). The amino acid sequence of bovine intestinal calcium-binding protein. *J Biol Chem* 256(11): 5669-74.

Harcourt-Brown, F. (2002). Biological characteristics of the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculi*). Textbook of Rabbit Medicine. F. Harcourt-Brown. Kent, Elsevier Science: 1-18.

Harcourt-Brown, F. M. (1996). Calcium deficiency, diet and dental disease in pet rabbits. *Vet Rec* 139(23): 567-71.

Haussler, M. R. (1986). Vitamin D receptors: nature and function. *Annu Rev Nutr* 6: 527-62.

Haussler, M. R., P. W. Jurutka, J. C. Hsieh, P. D. Thompson, S. H. Selznick, C. A. Haussler und G. K. Whitfield (1995). New understanding of the molecular mechanism of receptor-mediated genomic actions of the vitamin D hormone. *Bone* 17(2 Suppl): 33S-38S.

Hoenderop, J. G., B. Nilius und R. J. Bindels (2005). Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* 85(1): 373-422.

Hoenderop, J. G., A. W. van der Kemp, A. Hartog, S. F. van de Graaf, C. H. van Os, P. H. Willems und R. J. Bindels (1999). Molecular identification of the apical Ca<sup>2+</sup> channel in 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-responsive epithelia. *J Biol Chem* 274(13): 8375-8.

Hunziker, W. und S. Schrickel (1988). Rat brain calbindin D28: six domain structure and extensive amino acid homology with chicken calbindin D28. *Mol Endocrinol* 2(5): 465-73.

Junqueira, L., J. Carneiro und R. Kelley (2002). Verdauungstrakt. Histologie. M. Gratzel. München, Springer Verlag: 248-272.

Kallfelz, F. A., A. N. Taylor und R. H. Wasserman (1967). Vitamin D-induced calcium binding factor in rat intestinal mucosa. *Proc Soc Exp Biol Med* 125(1): 54-8.

Kamphues, J., P. Carstensen, D. Schroeder, H. meyer, H. A. Schoon und M. Rosenbruch (1985). Effekte einer steigenden Calcium- und Vitamin D-Zufuhr auf den Calciumstoffwechsel von Kaninchen. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*(56): 191-208.

Kamphues, J., D. Schneider und J. Leibetseder (2004). Supplemente zu Vorlesungen und Übungen in der Tierernährung. Hannover, M. & H. Schaper Alfeld.

Karbach, U. und H. Feldmeier (1993). The cecum is the site with the highest calcium absorption in rat intestine. *Dig Dis Sci* 38(10): 1815-24

Kaune, R. (1999). Knochenstoffwechsel. Physiologie der Haustiere. W. von Engelhardt und G. Breves. Stuttgart, Enke: 621-625.

Kraft, W., M. Füll, H. Bostedt und K. Heinritzi (2005). Skelettmuskulatur, Knochen, Kalzium-, Phosphor-, Magnesiumstoffwechsel. Labordiagnostik in der Tiermedizin. W. Kraft und U. Dürr. Stuttgart, Schattauer: 266-280.

Lauff, K. (2009). Einfluss von Calcium und Vitamin D auf den Knochenstoffwechsel und die Intensität der Vitamin-D-Rezeptoren sowie Calbindin D9k-Immunreaktionen im Gastrointestinaltrakt von Ziegenlämmern. Zürich, Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich.

Li, Y. C., M. J. Bolt, L. P. Cao und M. D. Sitrin (2001). Effects of vitamin D receptor inactivation on the expression of calbindins and calcium metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281(3): E558-64.

Liebich, H. (2003). Verdauungsapparat (apparatus digestorius). Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. H. Liebich. München, Schattauer: 187-238

Liesegang, A., B. Burger, M. Clauss und G. Kuhn (2008). Intestinal calcium absorption capacity is dependent on dietary calcium content in rabbits.

Liesegang, A., K. Riner und A. Boos (2007). Effects of gestation and lactation on vitamin D receptor amounts in goats and sheep. *Domest Anim Endocrinol* 33(2): 190-202.

Liesegang, A., K. Singer und A. Boos (2008). Vitamin D receptor amounts across different segments of the gastrointestinal tract in Brown Swiss and Holstein Frisian cows of different age. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 92(3): 316-23.

- Marcus, C. S. und F. W. Lengemann (1962). Absorption of Ca<sup>45</sup> and Sr<sup>85</sup> from solid and liquid food at various levels of the alimentary tract of the rat. *J Nutr* 77: 155-60.
- Müller, T. (2010). Calcium-Fluxe, Vitamin D-Rezeptoren und Calbindin D9k im Darm des Pferdes. Zürich, Universität Zürich: 73.
- Nijenhuis, T., J. G. Hoenderop und R. J. Bindels (2005). TRPV5 and TRPV6 in Ca(2+) (re)absorption: regulating Ca(2+) entry at the gate. *Pflugers Arch* 451(1): 181-92.
- Norman, A. W. (2006). Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 147(12): 5542-8.
- O'Malley, B. (2008). Klinische Anatomie und Physiologie bei kleinen Heimtieren, Vögeln, Reptilien und Amphibien. München, Elsevier GmbH.
- Parmentier, M., M. Ghysens, F. Rypens, D. E. Lawson, J. L. Pasteels und R. Pochet (1987). Calbindin in vertebrate classes: immunohistochemical localization and Western blot analysis. *Gen Comp Endocrinol* 65(3): 399-407.
- Peng, J. B., E. M. Brown und M. A. Hediger (2003). Apical entry channels in calcium-transporting epithelia. *News Physiol Sci* 18: 158-63.
- Peng, J. B., X. Z. Chen, U. V. Berger, P. M. Vassilev, H. Tsukaguchi, E. M. Brown und M. A. Hediger (1999). Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J Biol Chem* 274(32): 22739-46.
- Perez, A. V., G. Picotto, A. R. Carpentieri, M. A. Rivoira, M. E. Peralta Lopez und N. G. Tolosa de Talamoni (2008). Minireview on regulation of intestinal calcium absorption. Emphasis on molecular mechanisms of transcellular pathway. *Digestion* 77(1): 22-34.
- Redrobe, S. (2002). Calcium Metabolism in Rabbits. *Journal of Exotic Pet Medicine* 11(2): 91-101.
- Ricken, G. (2005). Transport von Calcium über das isolierte Pansenepithel des Rindes. Hannover, Tierärztliche Hochschule.
- Sakaguchi, E. (2003). Digestive strategies of small hindgut fermenters. *Anim Sci J* 74: 327-337.
- Salomon, F. V. (2005). Verdauungsapparat, Apparatus digestorius. Anatomie für die Tiermedizin. F. V. Salomon, H. Geyer und U. Gille. Stuttgart, Enke: 236-312.
- Scharrer, E. und S. Wolfram (2000). Funktionen des Dünndarms und seiner Anhangsdrüsen. Physiologie der Haustiere. W. von Engelhardt und G. Breves. Stuttgart, Enke: 369-394.
- Schley, P. (1985). Körperbau und Organfunktionen. Kaninchen. H. Kräuslich. München, Ulmer: 18-26.

- Schlögl, W. (2003). Fütterung. Das grosse Buch vom Kaninchen. W. Schlögl. Frankfurt am Main, DLG-Verlags-GmbH: 206-212.
- Sprekeler, N. (unveröffentlicht). Expression Patterns of Intestinal Calcium Transport Elements and in vitro Absorption of Calcium in the Horse. Zürich, Universität Zürich: Schröder, B., I. Rittmann, E. Pfeffer und G. Breves (1997). In vitro studies on calcium absorption from the gastrointestinal tract in small ruminants. *J Comp Physiol B* 167(1): 43-51.
- Schulze, A. (2005). Besonderheiten der Anatomie der Heimtiere. Anatomie für die Tiermedizin. F. V. Salomon, H. Geyer und U. Gille. Stuttgart, Enke: 726-734.
- Sidler-Lauff, K., A. Boos, M. Kraenzlin und A. Liesegang (2009). Influence of different calcium supplies and a single vitamin D injection on vitamin D receptor- and calbindin D9k-immunoreactivities in the gastrointestinal tract of goat kids. *J Anim Sci*.
- Smith, M. W., M. E. Bruns und E. D. Lawson (1985). Identification of intestinal cells responsive to calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol). *Biochem J* 225(1): 127-33.
- Sooy, K., T. Schermerhorn, M. Noda, M. Surana, W. B. Rhoten, M. Meyer, N. Fleischer, G. W. Sharp und S. Christakos (1999). Calbindin-D(28k) controls [Ca(2+)](i) and insulin release. Evidence obtained from calbindin-d(28k) knockout mice and beta cell lines. *J Biol Chem* 274(48): 34343-9.
- Stanik, K. (2006). Tierartlich vergleichende Literatur und experimentelle Arbeiten zu Effekten unterschiedlicher Calcium-Aufnahmen auf die Calcium-Homöostase beim arbeitenden Pferd. Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover: 285.
- Taylor, A. N., W. A. Gleason, Jr. und G. L. Lankford (1984). Immunocytochemical localization of rat intestinal vitamin D-dependent calcium-binding protein. *J Histochem Cytochem* 32(2): 153-8.
- van Abel, M., J. G. Hoenderop, A. W. van der Kemp, J. P. van Leeuwen und R. J. Bindels (2003). Regulation of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels in small intestine as studied by quantitative mRNA detection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285(1): G78-85.
- van de Graaf, S. F., J. G. Hoenderop und R. J. Bindels (2006). Regulation of TRPV5 and TRPV6 by associated proteins. *Am J Physiol Renal Physiol* 290(6): F1295-302.
- Van Eldik, L. J., J. G. Zengedui, D. R. Marshak und D. M. Watterson (1982). Calcium-binding proteins and the molecular basis of calcium action. *Int Rev Cytol* 77: 1-61.
- Vernay, M. (1987). Origin and utilization of volatile fatty acids and lactate in the rabbit: influence of the faecal excretion pattern. *Br J Nutr* 57(3): 371-81.
- von Engelhardt, W. und G. Breves (2000). Physiologie der Haustiere. Stuttgart, Enke.
- Walters, J. R. und M. M. Weiser (1987). Calcium transport by rat duodenal villus and crypt basolateral membranes. *Am J Physiol* 252(2 Pt 1): G170-7.



Wasserman, R. H., A. N. Taylor und F. A. Kalfelz (1966). Vitamin D and transfer of plasma calcium to intestinal lumen in chicks and rats. *Am J Physiol* 211(2): 419-23.

Weber, K., R. G. Erben, A. Rump und J. Adamski (2001). Gene structure and regulation of the murine epithelial calcium channels ECaC1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun* 289(5): 1287-94.

Weyrauch, K., A. Smollich und B. Schnorr (1998). Verdauungssystem. Histologie-Kurs für Veterinärmediziner. Stuttgart, Enke: 59-87.

Wiener, H., M. D. de Jong und C. H. van Os (1990). Active Ca<sup>2+</sup> transport systems in basolateral membranes from rabbit distal colon. *J Intern Med Suppl* 732: 119-24.

Wilkins, M. R., C. Kunert-Keil, H. Brinkmeier und B. Schroder (2009). Expression of calcium channel TRPV6 in ovine epithelial tissue. *Vet J* 182(2): 294-300.

Yamagishi, N., M. Miyazaki und Y. Naito (2006). The expression of genes for transepithelial calcium-transporting proteins in the bovine duodenum. *Vet J* 171(2): 363-6.

Yamagishi, N., Y. A. Yukawa, N. Ishiguro, S. Soeta, I. H. Lee, K. Oboshi und H. Yamada (2002). Expression of calbindin-D9k messenger ribonucleic acid in the gastrointestinal tract of dairy cattle. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 49(9): 461-5.

## 9 Anhang

### 9.1 Tabellen zu Kapitel 6 : Resultate

**Tabelle 3:** Mittelwerte (MW) und Standardfehler (StFe) der Calbindin-D9k-

Extinktionswerte aller untersuchten Kaninchen für den Vergleich der Darmabschnitte.

	Duodenum	Jejunum	Ileum	Caecum	Colon
<b>Gruppe L:</b>					
Tier L1	0.133	0.110		0.149	
Tier L2	0.148			0.143	
Tier L3	0.118			0.149	
Tier L4	0.213	0.084		0.234	
Tier L5	0.118			0.172	
Tier L6	0.133			0.201	
MW + StFe	0.14 ± 0.01	0.1 ± 0.01		0.17 ± 0.01	
<b>Gruppe G:</b>					
Tier G1	0.132			0.080	
Tier G2	0.101			0.100	
Tier G3	0.105			0.093	
Tier G4	0.099			0.096	
Tier G5	0.138			0.095	
Tier G6	0.131			0.124	
MW + StFe	0.12 ± 0.01			0.1 ± 0.01	
<b>Gruppe LG:</b>					
Tier LG1	0.137			0.222	0.088
Tier LG2	0.165			0.128	0.116
Tier LG3	0.172		0.079	0.150	0.156
Tier LG4	0.165			0.140	
Tier LG5	0.144			0.198	
Tier LG6	0.157			0.186	0.048
MW + StFe	0.16 ± 0.01		0.08 ± 0.00	0.17 ± 0.02	0.1 ± 0.02
<b>Gruppe GG:</b>					
Tier GG1	0.085			0.081	
Tier GG2	0.125			0.069	
Tier GG3	0.193			0.048	
Tier GG4	0.150			0.047	
Tier GG5				0.098	
Tier GG6	0.136			0.061	
MW + StFe	0.14 ± 0.02			0.07 ± 0.01	

Fütterungsgruppen: L = Luzernemehl; G = Grasmehl; LG = Luzerne- und Getreidemehl;  
GG = Gras- und Getreidemehl

**Tabelle 4a:** Mittelwerte (MW) und Standardfehler (StFe) der Calbindin-D9k-Extinktionswerte der Epithellokalisierungen des Duodenums in Abhängigkeit von der Fütterung.

	DD-ZB	DD-ZM	DD-ZS	DD-Total
<b>Gruppe L:</b>				
Tier L1	0.184	0.162	0.162	0.170
Tier L2	0.143	0.152	0.160	0.151
Tier L3	0.171	0.174	0.195	0.180
Tier L4	0.142	0.132	0.151	0.142
Tier L5	0.174	0.171	0.176	0.174
Tier L6	0.143	0.139	0.140	0.140
MW + StFe	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01
<b>Gruppe G:</b>				
Tier G1	0.131	0.137	0.132	0.133
Tier G2	0.082	0.082	0.080	0.081
Tier G3	0.115	0.117	0.115	0.115
Tier G4	0.104	0.118	0.125	0.116
Tier G5	0.114	0.123	0.117	0.118
Tier G6	0.127	0.136	0.131	0.132
MW + StFe	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01
<b>Gruppe LG:</b>				
Tier LG1	0.159	0.150	0.167	0.158
Tier LG2	0.122	0.130	0.121	0.124
Tier LG3	0.166	0.185	0.171	0.166
Tier LG4	0.166	0.165	0.177	0.170
Tier LG5	0.154	0.140	0.166	0.153
Tier LG6	0.104	0.115	0.113	0.111
MW + StFe	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.15 ± 0.01
<b>Gruppe GG:</b>				
Tier GG1	0.118	0.136	0.147	0.134
Tier GG2				
Tier GG3	0.146	0.167	0.137	0.150
Tier GG4	0.098	0.097	0.117	0.104
Tier GG5	0.116	0.139	0.120	0.125
Tier GG6	0.109	0.113	0.125	0.116
MW + StFe	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.03 ± 0.01

Fütterungsgruppen: L = Luzernemehl; G = Grasmehl; LG = Luzerne- und Getreidemehl; GG = Gras- und Getreidemehl

Epithellokalisierungen: DD ZB = Duodenum Zottenbasis; DD ZM = Duodenum Zottenmitte; DD ZS = Duodenum Zottenspitze

**Tabelle 4b:** Mittelwerte (MW) und Standardfehler (StFe) der Calbindin-D9k-Extinktionswerte der Epithellokalisierungen des Caecums in Abhängigkeit von der Fütterung.

	Cae-KrM	Cae-ObEp	Cae-Total
<b>Gruppe L:</b>			
Tier L1	0.109	0.122	0.115
Tier L2	0.275	0.208	0.240
Tier L3	0.257	0.212	0.234
Tier L4	0.236	0.234	0.235
Tier L5	0.242	0.218	0.223
Tier L6	0.197	0.173	0.185
MW + StFe	0.22 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.20 ± 0.02
<b>Gruppe G:</b>			
Tier G1	0.097	0.106	0.102
Tier G2	0.104	0.111	0.108
Tier G3	0.123	0.141	0.132
Tier G4	0.104	0.106	0.105
Tier G5	0.097	0.119	0.108
Tier G6	0.101	0.103	0.102
MW + StFe	0.10 ± 0.00	0.11 ± 0.00	0.11 ± 0.00
<b>Gruppe LG:</b>			
Tier LG1	0.184	0.163	0.173
Tier LG2	0.198	0.174	0.186
Tier LG3	0.146	0.146	0.146
Tier LG4	0.161	0.133	0.147
Tier LG5	0.204	0.210	0.207
Tier LG6	0.144	0.161	0.153
MW + StFe	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.01
<b>Gruppe GG:</b>			
Tier GG1	0.104	0.095	0.099
Tier GG2	0.098	0.099	0.099
Tier GG3	0.108	0.123	0.114
Tier GG4	0.112	0.104	0.108
Tier GG5	0.132	0.124	0.128
Tier GG6	0.101	0.104	0.102
MW + StFe	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.00	0.11 ± 0.00

Fütterungsgruppen: L = Luzernemehl; G = Grasmehl; LG = Luzerne- und Getreidemehl; GG = Gras- und Getreidemehl

Epithellokalisierungen: Cae KrM = Caecum Kryptenmündung; Cae ObEp = Caecum Oberflächene-  
pithel

## 10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben. Im Besonderen danke ich:

**Prof. Dr. Alois Boos** für das Überlassen des Themas, die gute Betreuung und die gewissenhafte Durchsicht dieser Arbeit.

**PD Dr. Annette Liesegang** für die Übernahme des Korreferats, die Ausarbeitung der Idee, die Entnahme und die Aufarbeitung der Proben sowie die freundliche und geduldige Hilfe bei der statistischen Auswertung.

**PD Dr. Marcus Clauss** für die Hilfe bei den Probenentnahmen.

**Dr. med. vet. Bettina Burger** für die Betreuung der Tiere und die Hilfe bei der Probenentnahme.

**Sissi Hoegger** für die geduldige Einführung in die Labortechnik, sowie Ihre grosse Hilfsbereitschaft bei sämtlichen Laborarbeiten.

**Kati Ziinsky** und **Monika Hilbe** für die Hilfe und den Tipp in Bezug auf den Sekundärantikörper.

**Jeanne Peter** für ihre fantastische Unterstützung bei der graphischen Arbeit und die amüsanten Unterhaltungen.

**Dr. med. vet. Thérèse de Vries**, **Dr. med. vet. Constanze Führer** und **Dr. med. vet. Sylvia Leimbacher** für die äusserst warmherzige Aufnahme in das Assistentinnen-Team und die Einführung als Mitdotorandin.

**Dr. med. vet. Kerstin Lauff** für ihre freundschaftliche Unterstützung und die tollen Ratschläge (u.a. für die mikroskopische Auswertung).

Meinen Mitdotorandinnen **Nele Sprekeler**, **Barbara Fox**, **Birgit Harrer** und **Andrea Meier** und meinem Mitdotoranden **Tobias Müller** für die treue Hilfe bei Problemen jeglicher Art, die Freundschaft und die schöne, gemeinsame Zeit in der Anatomie.

Meinen **Eltern** und **Schwiegereltern** für die zahlreichen Hütedienste und die Unterstützung jeglicher Art während dem Erstellen dieser Arbeit.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Mann **Christian** für seine Liebe, seine stetige Unterstützung sowie für sein offenes Ohr für alle Lebensfragen!

Natürlich danke ich auch meinen beiden grossartigen Kindern, **Gion** und **Luc**, für all die abwechslungsreichen Stunden neben der Arbeit.

## 11 Lebenslauf

Name:	Corinne Schroeter-Vogt
Geburtsdatum:	20.03.1976
Heimatort:	Bettlach, Zürich, Courtepin
Zivilstand:	Verheiratet
1983 - 1988	Primarschule, Bettlach (SO)
1988 - 1991	Progymnasium, Bezirksschule Grenchen (SO)
1991 - 1996	Wirtschaftsgymnasium, Maturität Typus E, Kantonsschule Solohturn
1997 - 1999	Diplom Bank Allrounder UBS (SBV anerkannt) Allroundpraktikum UBS AG, Zürich
1999 - 2002	Portfoliomanagerin UBS AG, Zürich
2000 - 2001	Private Banking Diploma UBS AG, Zürich
2002 - 2007	Studium der Veterinärmedizin an der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich Staatsexamen im Herbst 2007
2007 - 2011	Erstellung der Dissertation am Veterinär-Anatomischen Institut der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich bei Prof. Dr. med. vet. A. Boos und Anstellung als Assistentin
Ab Februar 2011	Anstellung als Assistenztierärztin in einer Gemischtpraxis in Birmensdorf bei Dres. med. vet. F. Rohner und A. Huber

Zürich, Februar 2011